

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 June 1999 (15.06.99)	
International application No. PCT/EP98/06547	Applicant's or agent's file reference 982066wo Me
International filing date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)	Priority date (day/month/year) 15 October 1997 (15.10.97)
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

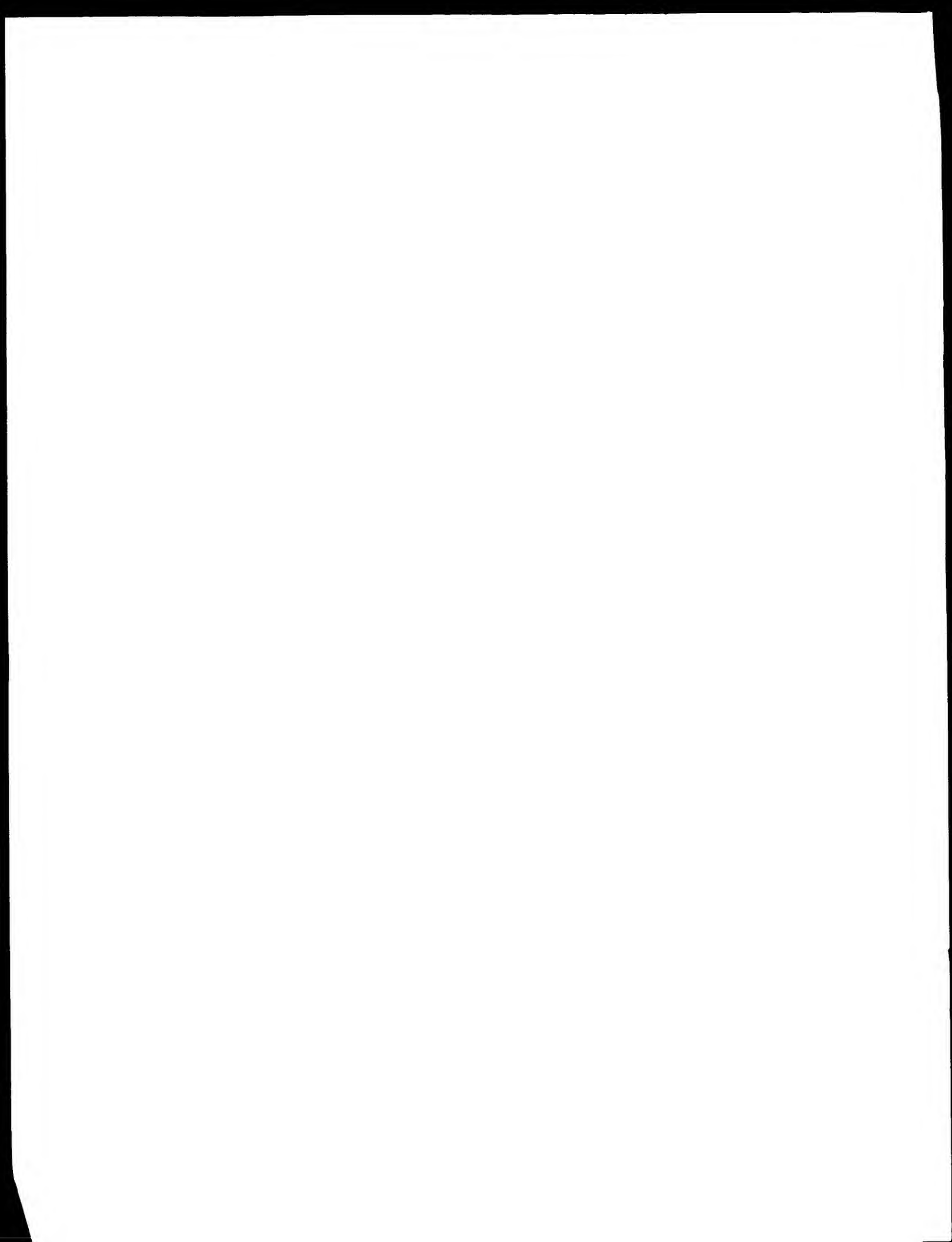
☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 May 1999 (07.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Lazar Joseph Panakal
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



Cadherin Derived Growth Factor und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide (Eiweißstoffe) mit zellproliferativen, zelldifferenzierenden und/oder zellprotektiven Eigenschaften, die als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnet werden sowie ihre Verwendung.

Aufgabe der Erfindung ist es, Peptide bereitzustellen, die zellproliferativen, zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Eigenschaften aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe durch als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnete Peptide, deren Sequenz einer Teilsequenz eines Fra-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Präpro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.

Die zellproliferative Wirkung läßt sich beispielsweise an primären Osteoblasten aus Fattencalvarien, die zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Wirkungen an primären Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen bestimmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins, d.h. des um die Signalsequenz verkürzten Fra-Pro-Cadherins.

- 2 -

Besonders bevorzugt handelt es sich um den N-Terminus des Pro-Cadherins, also den Teil, der bei der Prozessierung des Pro-Cadherins zum Cadherin abgespalten wird, bzw. um ein N- oder C-terminal verkürztes Fragment davon.

Vorzugsweise weist der CDGF keinen Cadherin repeat auf.

Erfindungsgemäß bevorzugte Ausführungsformen sind Peptide mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFVPERHLERGRVLGRVNFCTGEQRTAYFSLDTRFKVGTGCVITVKR-
FLRFHNPOIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNGHHHPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSF-
GLFELQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVQYESSEPADFKVD-
EDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEVEEIVF-
PRQFSKHSGLLQROKR

Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREA EVTLEAGCAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDNDFFTVRNGETVQER-
RSLKERNPLKIFPSKRILRRHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTRETCKAGFSEDDYTALISQNILEGKLLQVKSSCVGKTQYETNSMDFKG-
ADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWD AVLVAQTSSPHSGHKPQKGKKVVA-
LDFSPFPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANFAQRDTHSLLPTHRQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKFTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

- 3 -

Cadherin-8 human:

KLLDHWTPLEIILWITLPPCIYMAPMNQSDVLMSSGFLELNSLGEEQRILNRSKE

Cadherin-E human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

EAPERRGHLRPSFHHGHEKSGKEGQVLQRSKE

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (26-51):

ERRGHLRPSFHHGHEKSGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-54):

DEQFQQTLLATEPRENVHILPGQRSHEFQVRKR

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-52):

QFQFQQTLLATEPRENVHILPGQRSHEFQRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFDCKGNKLRVEVSSPYFKVNSDGG-
LVALENITAVGKTLFVHARTFHAFFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPRQKRP-
SVLLLSLESLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (21-60):

VPGWERPTTLYPWRRAPALSRVPRAWVIFPISVSENHKR.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Protein ein aus dem Menschen erhältliches Protein oder eine natürlich vorkommende humane Variante davon.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein neues Protein, das Teile der Aminosäuresequenz von CDGF umfaßt. Die Erfindung betrifft vorzugsweise einen CDGF, welcher die oben dargestellten Aminosäuresequenzen enthält, er kann jedoch auch Varianten dieser Sequenzen enthalten. Unter dem Begriff "Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Sequenzen zu verstehen, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner

Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte sich von den oben dargestellten Aminosäuresequenzen der CDGF unterscheiden.

Unter dem Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der CDGF sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.

Konservative Austausche sind beispielsweise Y für/gegen V, K für/gegen S, A für/gegen S, D für/gegen E, G für/gegen S, R für/gegen Q, F für/gegen A, Q für/gegen K.

Erfindungsgemäß beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für die Peptide oder Derivate codieren oder komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga handeln. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der CDGF in vivo im Sinne einer Gentherapie sowie als Antisensenukleotide zur Verringerung der Expression. Auch Vektoren, die die Nukleinsäuren enthalten sind Gegenstand der Erfindung. Die Vektoren eignen sich insbesondere zur Expression des Peptides in gentechnisch veränderten Organismen.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen CDGF oder Derivate davon gerichtet sind sowie Antagonisten/Inhibitoren, die gegen CDGF, ein Derivat oder eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der CDGF verbunden sind sowie zum Einsatz in der Diagnostik.

Die erfindungsgemäßen CDGF, Derivate, Verbindungen, Nukleinsäuren, Antikörper und/ oder Antagonisten/Inhibitoren können zusammen mit üblichen Hilfsmitteln als Arzneimittel verwendet werden. Es wird besonders bevorzugt, daß die Arzneimittel in

- 5 -

geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, bukalen, intravenösen, intramuskularen, intracutanen, intrathekalen, intranasalen, lokal-topischen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation vorliegen.

Die Menge an zu verabreichendem Arzneimittel beträgt bevorzugt 1 µg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid, gegebenenfalls in markierter Form, wie in fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting.

Die Diagnostikmittel eignen sich zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis sowie als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs (Tumormarker).

Die erfindungsgemäßen CDGF und ihre Derivate sind durch Isolierung erhältlich aus Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie. Totalsynthetisch sind die erfindungsgemäßen Peptide durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese oder Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und anschließende Aufreinigung erhältlich. Auch durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren lassen sich die erfindungsgemäßen Peptide herstellen.

Beispielsweise wurde ein Peptid, das als OB-CDGF bezeichnet wird, mit chromatographischen Methoden aus humanem Hämofiltrat aufgereinigt und mit Hilfe eines Bioassays identifiziert.

Das Peptid besitzt eine Molekularmasse von 3062.8 Da. Bislang wurde über die Analyse einer cDNA eine OB-Cadherin Prä-Pro-Sequenz postuliert. In dieser aus der cDNA abgeleiteten Sequenz findet sich die erfindungsgemäße Peptidsequenz direkt hinter der putativen Signalsequenz (siehe Figur 1).

Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptides erfolgte durch Massenspektrometrie und Sequenzierung des gesamten Peptides. Die Sequenzanalyse des biologisch aktiven Peptides ergab die folgende Aminosäuresequenz für OB-CDGF:

ERRGHLEFSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Im ESI (Elektrospray Ionisation)-Massenspektrum des OB-CDGF wurde die Molekularmasse (MW) bestimmt mit:

OB-CDGF, MW 3062.8 Da

- 7 -

Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hamofiltrat erhältlich. Dieses Verfahren gemäß DE 36 33 707, welches die Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hamofiltrat offenbart, wurde in einer modifizierten Form durchgeführt.

Hamofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an. Das humane Hamofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1.5 bis 3.5, insbesondere 2.5 bis 3.0. Danach wird das Hamofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SF - 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0.5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an C4-modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Reinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie an C18-modifizierten Trägermaterialien überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekulmasse des nativen Peptids erfolgte mittels eines Elektrospray-Massenspektrometers. Die Sequenzanalyse erfolgte über einen Edman-Abbau der Peptide sowie von chemisch modifizierten Derivaten mit einem ABI 473 A Sequenzer.

Die Totalsynthese erfolgte an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese. Die Synthesestrategie und der Aufbau des Peptids und von ihm abgeleiteten Derivaten mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Das erfindungsgemäße OB-CDGF sowie seine cDNA, sein Gen und Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, der cDNA und dem Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des OB-CDGF aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden.

Figur 1 zeigt die Domänenstruktur der Cadherine.

Figur 2 zeigt die Chromatogramme der Isolierung des OB-CDGF aus Hämofiltrat. Die Identifizierung erfolgt durch ein Proliferationsassay an primären Osteoblasten. Einzelheiten der Aufreinigung können dem Beispiel 1 entnommen werden.

Figur 3 zeigt das Elektrospray-Massenspektrum des isolierten OB-CDGF. Aus den zweifach und dreifach protonierten Ionen berechnet sich ein Molekulargewicht vom 3.062 Dalton.

Figur 4 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve von chemisch synthetisiertem OB-CDGF auf die Proliferatin von primären Knochenzellen. In Figur 4a wird die Wirkung für eine Inkubationszeit von 72 Stunden, in Figur 4b für eine Inkubationszeit von 48 Stunden gezeigt. Gemessen wurde die Aufnahme von Bromdesoxyuridin (BrdU). Der Einbau von BrdU wurde mittels ELISA gemessen.

Figur 5 zeigt die spezifische Bindung von iodmarkiertem OB-CDGF an primäre Osteoblasten (monolayer) und an die Extracellulär Matrix (ecm) von primären Osteoblasten. Dargestellt ist die Verdrängung des markierten OB-CDGF durch nichtmarkiertes OB-CDGF bei steigender Konzentration der Menge an nichtmarkiertem OB-CDGF.

Figur 6 zeigt die Stimulation von primären Osteoblasten durch OB-CDGF Zugabe. Die intracelluläre Calciumkonzentration steigt

- 9 -

durch Zugabe von OB-CDGF an. Gemessen wurde der Calciumgehalt in Gegenwart von Fura 2 an Einzelzellen im Fluoreszenzmikroskop.

Figur 7 ist ein Westernblot, der die intracelluläre MAP-Kinaseaktivität nachweist. Diese Aktivität gilt als Parameter für die Rezeptor- und Calcium-vermittelte Zellantwort auf OB-CDGF an primären Osteoblasten. Die obere Bande (46 kD) zeigt die Konzentration der MAP-Kinase nach Stimulation mit fötalem Kälberserum FCS (links) oder OB-CDGF (rechts) in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Die untere Bande zeigt eine interne Kontrolle für den Zellaufschluß/Westernblot.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Hämofiltrat-Batch-Extraktion

800 bis 1.000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH-Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluß:	3 L/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Puffer B:	0.5 M Ammoniumacetat
Anlage:	Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der

- 10 -

gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8 - 7.2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

Erste präparative Auftrennung

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in Mengen von 5.000 bis 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf pH 2.7 wird der Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
 Fluß: bis zu 3 L/min während des Auftrages
 0.5 bis 1 L während der Elution
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
 Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

<u>Puffer</u> (mS/cm)	<u>pH-Wert</u>	<u>Puffersubstanzen</u>	<u>Leitfähigkeit</u>
Waschpuffer:	2.0	0.01 M HCl	1
Elutionspuffer 1:	3.6	0.1 M Zitronensäure- 1-hydrat	2.9
Elutionspuffer 2:	4.5	0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat	4.0
Elutionspuffer 3:	5.0	0.1 M Äpfelsäure	6.2
Elutionspuffer 4:	5.6	0.1 M Bernsteinsäure	6.1

- 11 -

Elutionspuffer 5:	6.6	0.1 M NaH_2PO_4	4.9
Elutionspuffer 6:	7.4	0.1 M NaH_2PO_4	6.7
Elutionspuffer 7:	9.0	0.1 M Ammoniumcarbonat	6.7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool 1-VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 l erreicht werden. Der Chromatogramm ist in Figur 2a gezeigt.

Zweite preparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reversed Phase Chromatographie getrennt.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial:	Source RPC, 15 μm 10 x 12.5 cm (FineLine 100)
Fluß:	150 mL/min (FineLine 100)
Detektion:	260 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A:	10 mM HCl
Puffer B:	60% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient:	0-60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Das Chromatogramm ist in Figur 2 b gezeigt. Aliquots der Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Semipreparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Bioassay aktive Fraktion 13 aus pH-Pool VI wurde über eine semipreparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 6-7 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Vydac RP-C18 15-20 Fm, 300 Å
Puffer A: 0,1 % TFA
Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % Acetonitril
Gradient: 5 - 50% B in 45 min, 50 - 100% B in 10 min
Fluß: 42 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieanlage: BioCad
Fraktionen: á 1.5 min ab Start des Gradienten

Das Chromatogramm ist in Figur 2c gezeigt.

Massenbestimmungen

Alle Massenbestimmungen der nativen und synthetischen Peptide wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer (ESI-MS) durchgeführt. Die Molekülmassen des Peptids wurden entsprechend der oben gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt. Das Massenspektrum ist in Figur 3 gezeigt.

Sequenzbestimmung

Das gereinigte, native und das synthetisch hergestellte Peptid wurde mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Massenbestimmungen ergab sich folgende Aminosäuresequenz:

EREGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Daten-

banken durchgeführt. Die Sequenz entspricht den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen Cadherin-11 Precursors (Osteoblasten Cadherin, Propeptid, Aminosäuren 26-51).

Resynthese

Die Synthese des Peptids mit der Sequenz ERRSHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS wurde nach der Merrifield-Festphasen-Methode ausgehend von geschützten Fmoc-Aminosäuren durchgeführt. Das synthetische Peptid wurde über Umkehrphasen-Chromatographie aufgereinigt. Die Identität und Reinheit der Substanz wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie, Sequenzanalyse und Kapillarzonenoelektrophorese nachgewiesen.

Bestimmung der biologischen Aktivität von OB-CDGF (zellproliferativer Effekt)

Die Isolierung des OB-CDGF erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Proliferationsassay der primären Osteoblasten. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Reinigung unterzogen.

Der Assay mißt die Proliferation der Zellen, nachdem sie in serumfreien Medium mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin gehalten wurden, dann die Proben zugegeben wurden und nach weiteren 48 Stunden der Einbau von ³H-Thymidin oder Bromdeoxyuranosin (BrdU) bestimmt wurde. Als Positiv-Kontrolle wird in diesem Assay knochenwachstumsfördernde Faktoren wie IGF oder Angiotensin oder fetales Kalberserum (FCS) eingesetzt.

Die Experimente wurden in Anlehnung an Pfeilschifter et al., Endocrinology 126, 703, 1990, durchgeführt.

Die Gewinnung von primären Osteoblasten erfolgte durch sequen-

tielle Abdaunung mittels Collagenase aus fetalen Rattenkalvari-
en. Dabei wurden 5 Zellfraktionen erhalten. Der Pool aus den
Zellfraktionen 3-5 wurde in vitro kultiviert. Die Kultur der
Zellen erfolgte in einem Inkubator bei einer relativen Luft-
feuchte von 95%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur
von 37°C. Die Untersuchungen der Prüfsukstanzen erfolgte in
Kulturen der ersten, zweiten oder dritten Zellpassage.

Für die Untersuchung wurden die Zellen mindestens 95 Stunden
vor Aufgabe der Prüfsukstanzen in einer Zellzahl von 7×10^3 Zel-
len (in 100 µl Kulturmedium) / Well in Mikrotiterplatten (MTP)
mit Fundboden ausgesät. Dabei fand als Kulturmedium MEM Dul-
becco (plus 4,5 g/l Glukose plus 3,7 g/l NaHCO₃ ohne Glutamin)
Verwendung, dem 5% fetales Kalberserum (FKS) und 5000 U/ml Pe-
nicillin/Streptomycin zugesetzt werden.

Unmittelbar vor Zugabe der Prüfsukstanzen zur Zellkultur er-
folgte ein Austausch des Mediums gegen 150 µl Medium, das an-
stelle von FKS 1 mg/ml Rinderserumalbumin (RSA) enthielt.
Prüfsukstanzen wurden in den gewünschten Konzentrationen dem
RSA-haltigen Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde TGFβ₁
(Transforming growth factor β₁) in Konzentrationen von 0,1-
0,2 ng/ml mitgeführt. Pro (Positiv-) Kontrolle bzw. Substanz-
konzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Inkubation der Zellkulturen mit Prüfsukstanzen erfolgte 24
bis 72 Stunden, in den letzten 3 Stunden zusätzlich unter An-
wesenheit der Thymidinsonde (Zugabe von 1 µCi Methyl-³H-
Thymidin/MTP-Vertiefung in 20 µl PBS-Lösung).

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen 3x mit
0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit je
100 µl Flüssigszintillator (OptiPhase Supermix[®] der Firma Wal-
lac) versetzt. Im Anschluß daran erfolgte die Vermessung der
in die DNA eingebauten Radioaktivität in einem Flüssigszintil-
lationscounter (1450 MicroBeta[®] der Firma Wallac) in cpm.

- 15 -

Bei der Auswertung dienen Zellkulturen, die ausschließlich RSA-haltiges Medium erhalten hatten, als Kontrollen (100%).

Der OB-CDGF besitzt in dosisabhängiger Weise eine wachstumsfördernde Wirkung auf primäre Osteoblasten (Knochenzellen). Diese biologische Wirkung wurde sowohl für das native als auch für das synthetisch hergestellte Peptid nachgewiesen.

Beispiel 2

Bestimmung der biologischen Aktivität BR-CDGF

Das der CDGF-Region des Cadherin-12 BR-Cadherin; N-Cadherin-21 entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz QPQPQDTLATEPFENVHLFGIRSHFORV, welches nach der Festphasensynthese - wie unter Beispiel 1 für das OB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde, wurde auf seine überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen getestet.

Das Testmodell ist folgendermaßen aufgebaut:

Primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen (Embryonalentwicklung E10)

Die Präparation und Kultivierung erfolgt wie beschrieben von Borasio G.P., John J., Wittinghofer A., Barde Y.-A., Sendtner M. Heumann R. (1989) Neuron 2, 1087-1096. Zur Bestimmung von überlebensfördernden Effekten von Wirkstoffen wird die Bestimmung des cellularen LDH-Gehalts nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden eingesetzt. Hierzu wird das Kulturmedium durch Ausklopfen der Platte entfernt. Nur die vitalen Zellen bleiben an Plattenboden haften und können dann bestimmt werden. Zur Bestimmung des LDH-Gehalts wird der LDH-Zytotoxizitätstestkit von Boehringer Mannheim (BM) eingesetzt.

- 16 -

Die Kulturen werden in 96-Well Mikrotiterplatten als Duplikate eingesetzt. Auf jeder Platte wird eine NGF-Eichkurve mitgeführt und die biologische Aktivität der Substanzen in pg/mL NGF-Äquivalenten ausgedrückt. Als niedermolekulare Referenzsubstanz wird das Staurosporin-Derivat K252a in einer Konzentration von 300 nmol/L mitgeführt.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine überlebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen. Diese Zellen sind typische Nervenzellen, so daß BR-CDGF ein neuroprotektiver Faktor ist.

Beispiel 3

Bestimmung der biologischen Aktivität CAD6-CDGF (zellprotektiver Effekt)

Das der CDGF-Region des Cadherin-6 entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS, welches nach der Festphasensynthese - wie unter Beispiel 1 für das CB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde, wurde auf seine überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen getestet. Das Testmodell ist, wie in Beispiel 2 beschrieben, aufgebaut.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine überlebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen.

Beispiel 4

Bindungsassay von markiertem OB-CDGF an Osteoblasten

Die Bindung der osteoproliferativen Peptide an neonatale Rattenosteoblasten Monoschichten wurde unter Verwendung von ¹²⁵I markierten Peptiden durchgeführt. Die Iodierung erfolgte durch Chloramin T. Die spezifische Aktivität der Peptide beträgt 100.000 cpm/ng. Die Bindungsstudien wurden durchgeführt an

- 17 -

confluenten Schichten sowie der Extracelluar-Matrix einer ersten Passage von neonatalen Rattenosteoblasten. Die Zellen wurden serumhaltigem Medium für 24 Stunden inkubiert und dann vier mal mit PBS gewaschen und in 250 µl des Assaypuffers (20 mM HEPES, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,3) mit 61.000 cpm des iodmarkierten Peptids in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des unmarkierten Peptids für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann wurde der Inkubationspuffer entfernt und die Zellen viermal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 M NaOH solubilisiert. Die zellgebundene Aktivität wurde mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmt. Die entsprechenden Versuchsergebnisse sind in Figur 1 dargestellt. Mit Zunahme der Konzentration an nicht-markiertem OB-CDSF nimmt die Menge an spezifisch gebundenem markiertem OB-CDSF ab.

Beispiel 5

Intracelluläre Calciumfreisetzungen in primären Osteoblasten

Die intracelluläre Signalkette für Calcium²⁺ wird an einzelne Osteoblastenzellen gemessen. Die intracelluläre Ca²⁺-Aktivität von primären Osteoblasten wird mit dem Ca²⁺ empfindlichen Farbstoff Fura-2 (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) gemessen. Die primären Osteoblasten werden auf Glasträgern (Durchmesser 30 mm) für ein bis drei Tage kultiviert, die an einer Perfusionskammer eines invertierten Mikroskops (Axiomat IDC-UV, Zeiss, Göttingen, Deutschland) befestigt ist. Die Zellen wurden in einer modifizierten Krebs-Henseleit-Pufferlösung (KHB, Zusammensetzung 145 mM NaCl, 1,6 mM K₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 1,3 mM Calciumgluconat, 1,0 mM MgCl₂, 5,0 mM D-Glucose, pH 7,4) für 10 min bei 37°C mit 5 µM Fura-2/Acetoxymethylester gelöst in 0,1 g/l Pluronic F-127 (Sigma, Welsenhofen, Deutschland) in RPMI 1640 (PAA, Colbe, Deutschland) inkubiert.

Der Inkubation folgt eine Äquilibrierungsperiode von 10 bis 15 min in der die Zellen mit KHB-Lösung bei 37°C mit einer Perfusionsrate von etwa 5 ml/min gespült werden. Die Fura-2-

beladenen primären Osteoblasten werden bei 340, 360, 380 nm mit einem Hochgeschwindigkeitsfilterrad (Rotationsgeschwindigkeit 10 Herz), einem Einzelphotonzählrohr (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) und einer Xenonquarzlampe (XBO 75 W/OFR, Zeiss, Deutschland) als Licht-/Impulsquelle gemessen. Die Fura-2-Emission wird durch ein Langwellenfilter bei 510 nm mit einer Ultrafluar 125 x Glycerolimmersionslinse gemessen. Alle Messungen werden an einzelnen Zellen durchgeführt. Das Meßfeld wird mittels eines justierbaren Loch mit etwa 8 µm Durchmesser gewählt. Ausgewertet wird das Verhältnis der Photonenemission nach Anregen bei 340 und 380 nm. Die Rohdaten werden auf Autofluoreszenz und Rauschen korrigiert. Der so erhaltene Hintergrundwert wird von den Meßsignalen bei jedem Experiment abgezogen. Die Rohdaten werden berechnet und 10 benachbarte Datenpunkte werden gemittelt, um eine Zeitauflösung von 1 Hz zu erhalten. Die Fluoreszenz bei 360 nm wird verwendet um die Calciumaktivität zu prüfen. Alle Proben werden vor dem Experiment in einem Phosphatpuffer gelöst und wenigstens für 1 bis 2 Minuten gemessen. Die Kalibrierung des Ca^{2+} wird am Ende jedes Experiments durch Inkubation der Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophore, Ionomycin (10 µmol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in Gegenwart von 1,3 mmol Ca^{2+} bzw. nominaler Abwesenheit (5 mM Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl ether), N,N,N',N'-Tetraessigsäure, in Gegenwart von EGTA) gemessen. Nur Kalibrierungen sowohl mit Maximum- als auch Minimumwerten werden für die Bestimmung des Ca^{2+} -Wertes verwendet. Bei den Experimenten, bei denen die doppelte Kalibrierung nicht erfolgreich war, wird der Mittelwert aller Kalibrierung verwendet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Figur 6 gezeigt.

Beispiel 6

Wie bereits unter Beispiel 5 gezeigt, kann durch die Inkubation mit CDGF eine intrazelluläre Calcium-Freisetzung an primären Osteoblasten induziert werden. Um diese physiologische Antwort näher zu charakterisieren wurde der weitere intrazelluläre Signalweg ("down stream" vom Calcium) untersucht. Eine

- 19 -

mögliche Signaltransduktionskaskade ist die Aktivierung der MAP-Kinase, ein Enzym, das eine wesentliche Rolle bei der Signalvermittlung vom Zytoplasma in den Zellkern spielt. Bei der Weiterleitung des Signals kommt es zu einer Phosphorylierung des Enzyms, das mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden kann. Der Nachweis dieses Proteins kann somit im Westernblot erfolgen und stellt ein Maß für die Phosphorylierung wie auch für die Expression aufgrund des Stimulus dar. Primäre Osteoblasten wurden über verschiedene Zeiten mit Cadherin bzw. Kontrollen (FCS) inkubiert. Durch Zugabe des Antikörpers wurde im Westernblot die Expression des Enzyms (MAP-Kinase) in der Zelle nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, daß ohne einen Stimulus wie FCS oder OB-CDGF keine Expression stattfindet, während nach Stimulation eine deutliche Bande in der erwarteten Größe der MAP-Kinase erscheint (obere Bande). Je länger mit OB-CDGF stimuliert wurde, desto deutlicher wurde die erkennbare Bande. Dies zeigt eindeutig, daß OB-CDGF zu einer Expression der intrazellulären MAP-Kinase führt. Hieraus läßt sich schließen, daß CDGF rezeptorvermittelt über Calcium wirkt und die weitere Signalverarbeitung über die MAP-Kinase verläuft.

Patentansprüche

1. Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Präpro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.
2. CDGF gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellproliferativ auf primäre Osteoblasten aus Ratten-calvarien wirkt.
3. CDGF gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellprotektiv und/oder zelldifferenzierend auf primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen wirkt.
4. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins ist.
5. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Peptid handelt, das bei der Prozessierung von Pro-Cadherin zu Cadherin abgespalten wird oder um ein Fragment davon handelt.
6. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF keinen Cadherin repeat aufweist.

7. CDGF mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFVPRRHLEPGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTDSVIT-
VKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTNLNGHHHRPPPHQASVSGIQAEILLTFP-
NSSPGLRRQKF

Cadherin-2 human (34-159):

EASGEIALCKTGPELVYSAVLSKDVHEGQPLNVFSNCGKRKVQYESSSEPADF-
KVLDEGDMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEVE-
EIVFFRQFSKHSGHLQRQKR

Cadherin-3 human (17-107):

CRAVFFEA EVTLEAGGAEQEPGQALSKVFMGQEPALFSTDNDDEFTVRNGETVQER-
RSLKEFNPLKIFPSKRILAFHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTTRETCKAGFSEDDYTALISQNI LEGEKLLQVKSSCVGTKGTQYETNSMD-
FKGADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWDAVLVAQTSSPHSGHNPQKKGK-
KVVALDPSPPPKDTLLPWIQHJNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRFQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNFSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNFS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMSSSPLELNSLGEEQRI LNRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEFGKEGQVLQRSKF

FPRGHLRPSFHGHHEFGKEGQVLQRS (CB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-54):

QPQPQQT LATEPRENVIHLPGQRSHFQRVKR

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-52):

QPQPQQT LATEPRENVIHLPGQRSHFQRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSDCKGNDKLR YEVS SPYFKVNS-
DGGLVALRNITAVGKTLFVHARTPHAEFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPR-
QKRPSVLLLLSLFSLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

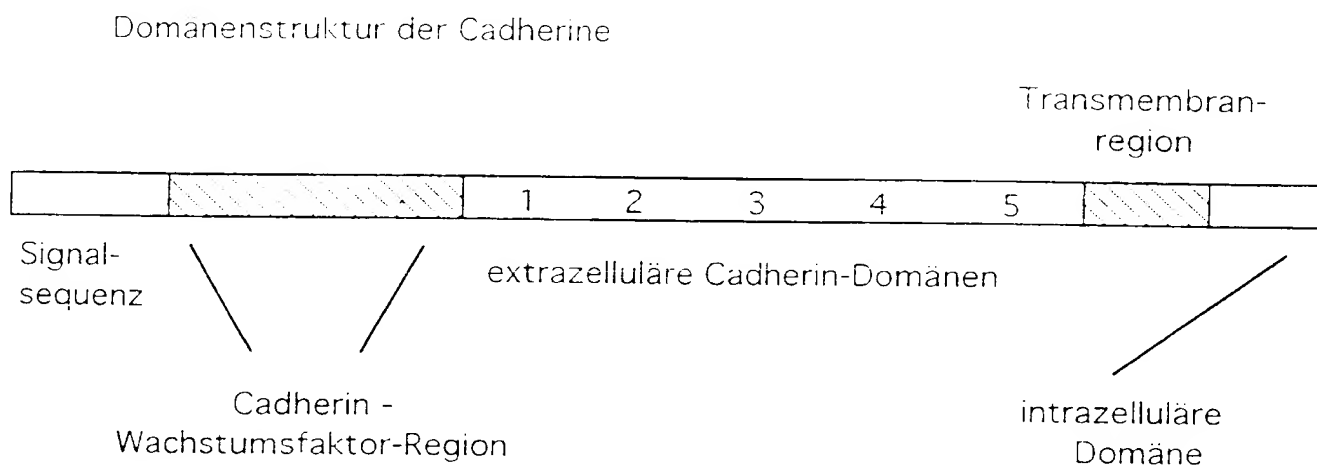
VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPI SVSENH KR

8. Varianten von CDGF, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um allelische Variationen der CDGF oder um durch in-vitro Mutagenese erhältliche Peptide handelt, die in ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.
9. Verbindung dadurch gekennzeichnet, daß sie CDGF oder Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 enthalten und zellproliferative, zellprotektive und/oder Zelldifferenzierende Eigenschaften aufweisen.
10. Nukleinsäuren codierend für CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, Varianten gemäß Anspruch 8 oder Verbindung gemäß Anspruch 9.
11. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 ist.
12. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga davon handelt.

13. Vektoren enthaltend Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Antikörper dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, eine Verbindung gemäß Anspruch 9 gerichtet sind.
15. Antagonist/Inhibitor dadurch gekennzeichnet, daß er gerichtet ist gegen CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, eine Verbindung gemäß Anspruch 9 oder gegen eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
16. Arzneimittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, Verbindungen gemäß Anspruch 9, Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
17. Diagnostikmittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, Verbindung gemäß Anspruch 9, Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
18. Arzneimittel gemäß Anspruch 16 in geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
19. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 16 oder 18 zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und

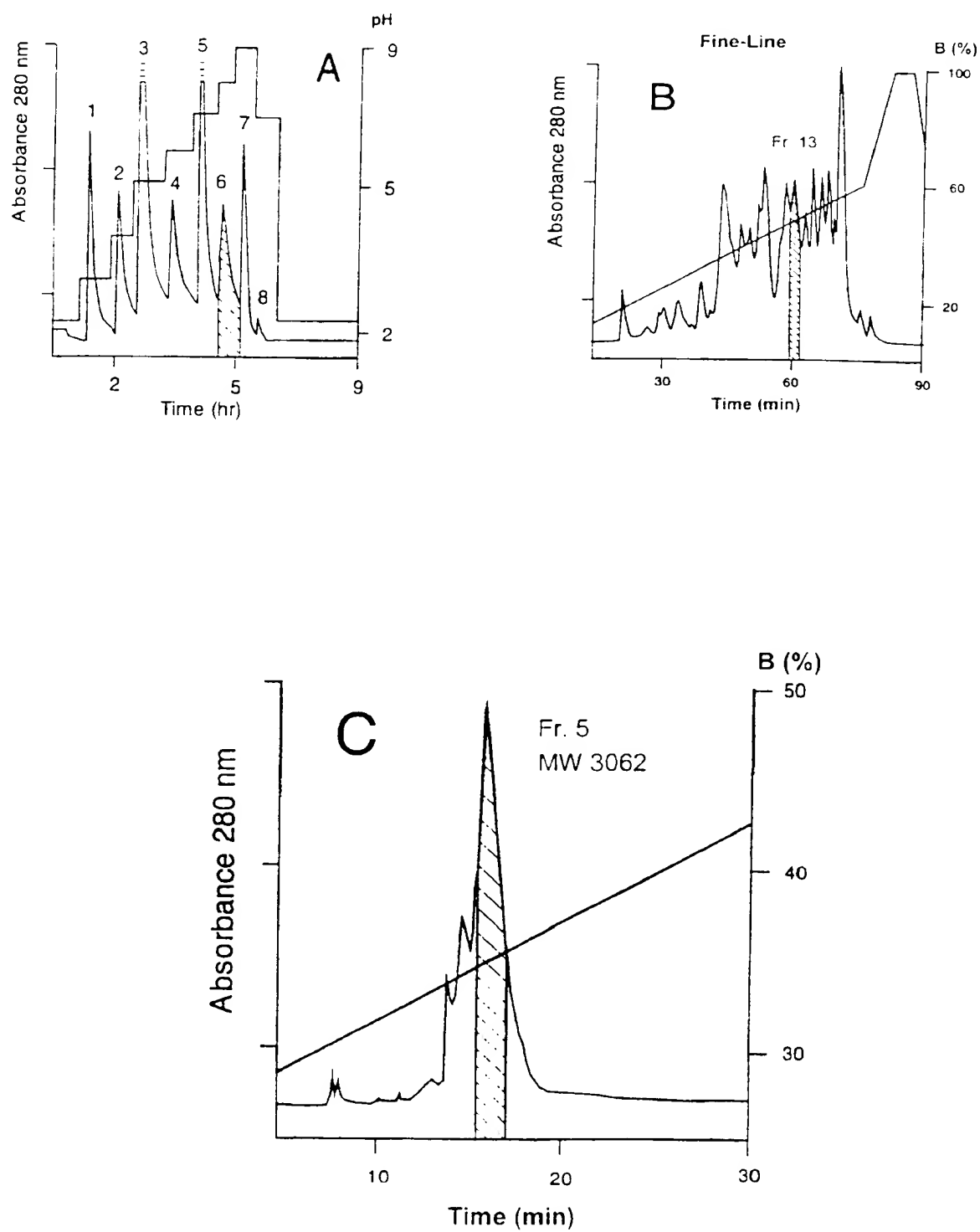
zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

20. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 17 zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis.
21. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 17 als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Tumormarker.
22. Verfahren zur Herstellung von CDGF oder gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, Varianten gemäß Anspruch 8 oder Verbindung gemäß Anspruch 9 aus Hämofiltrat
 - durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie oder
 - durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und Aufreinigung oder
 - durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.



Figur 1

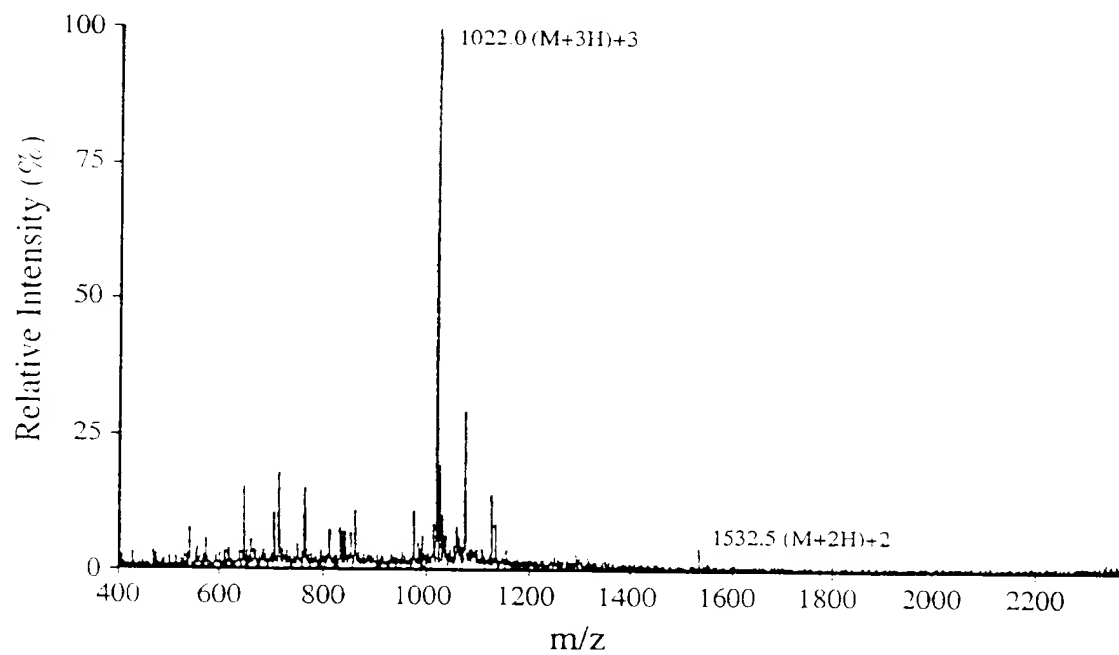




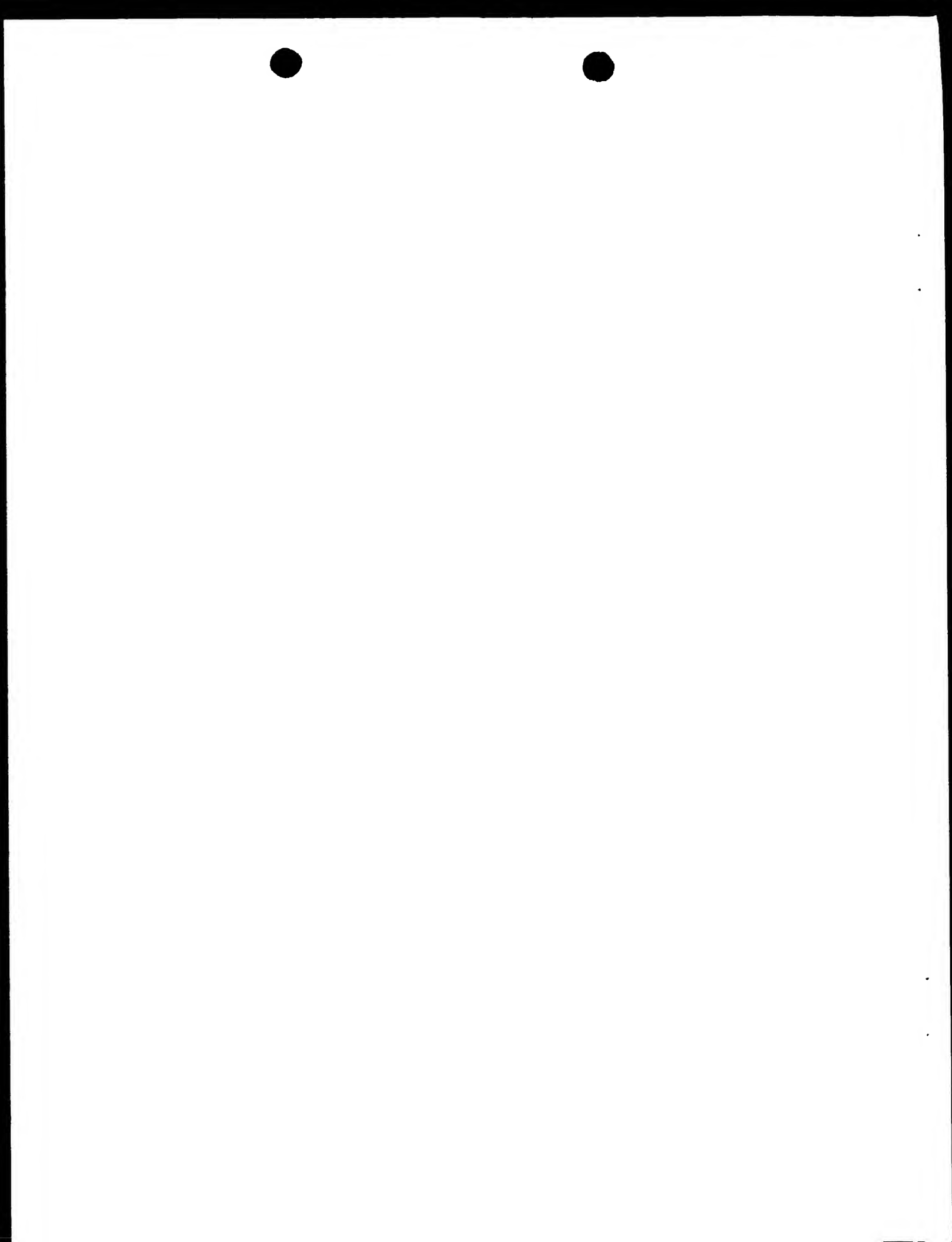
Figur 2



3 / 7



Figur 3



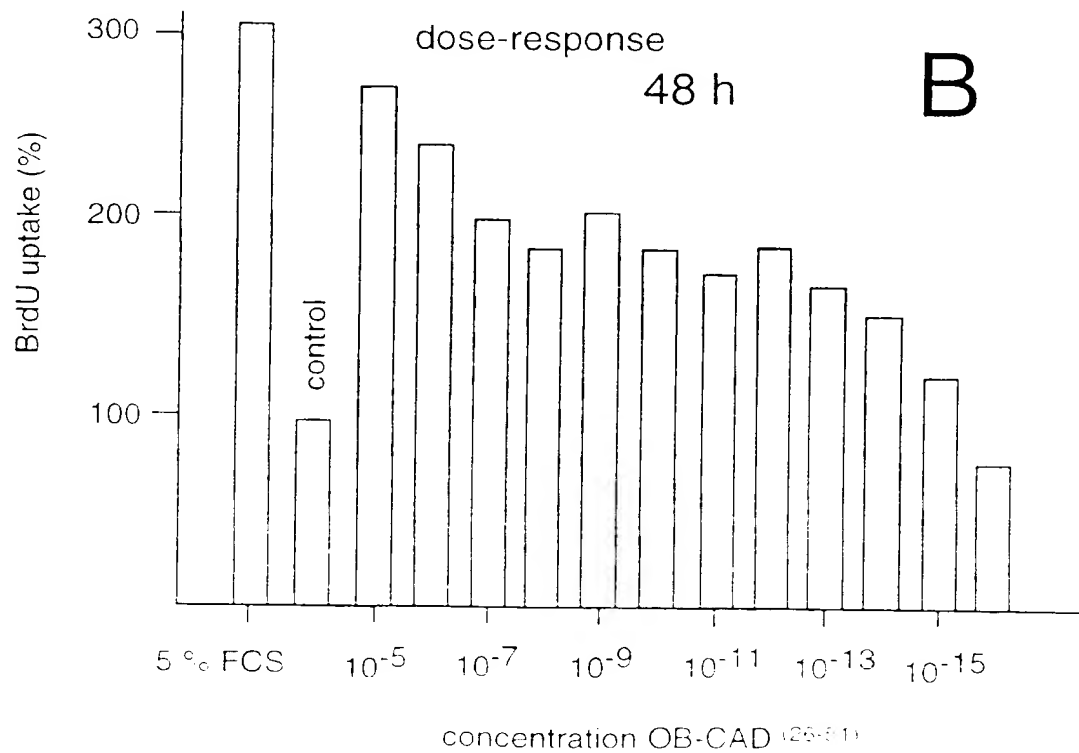
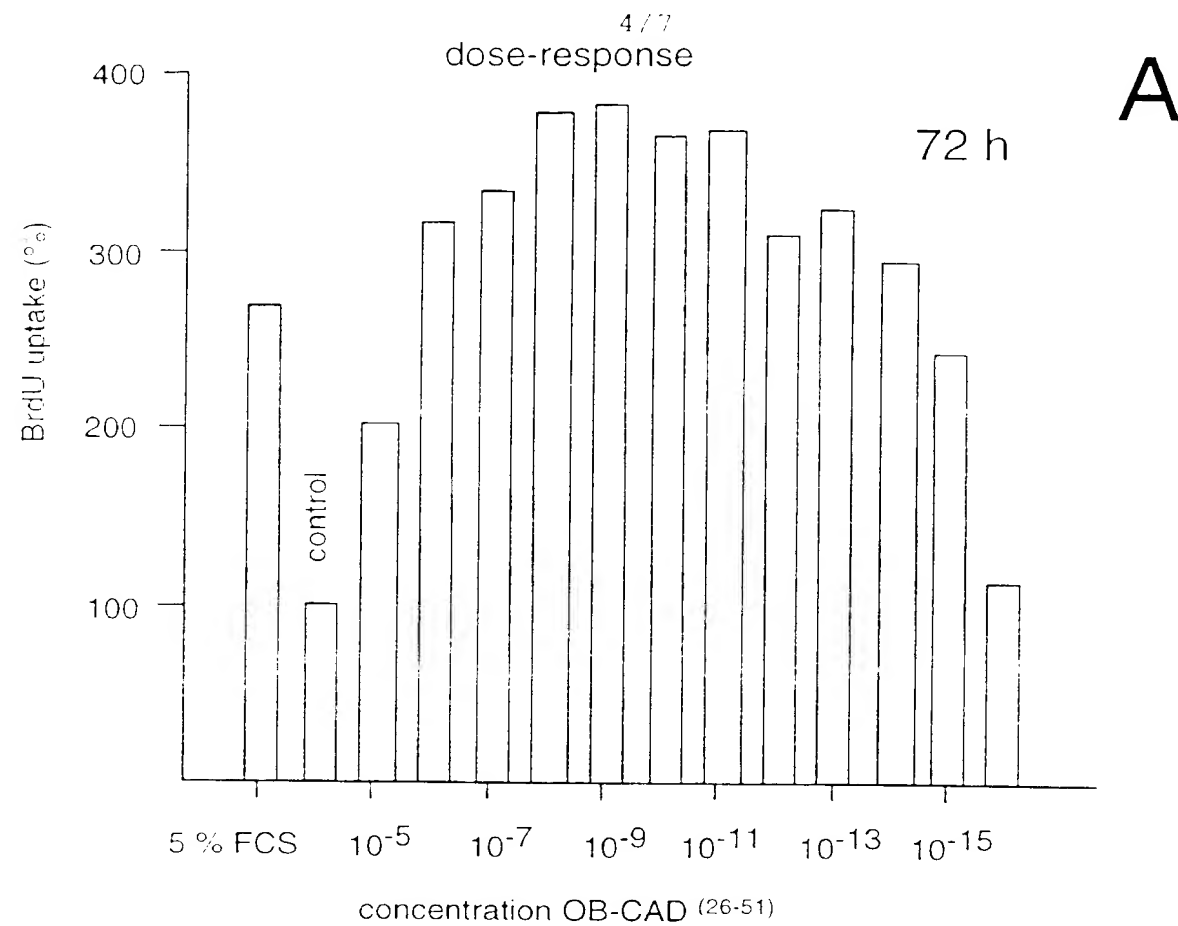
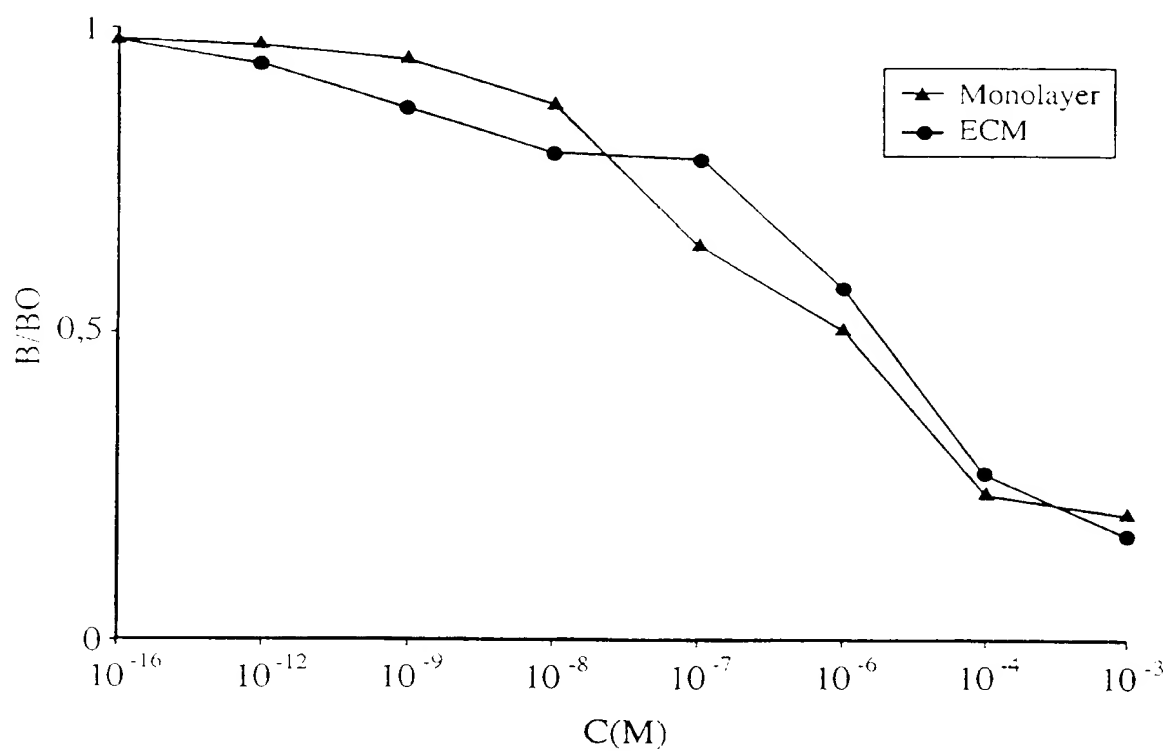
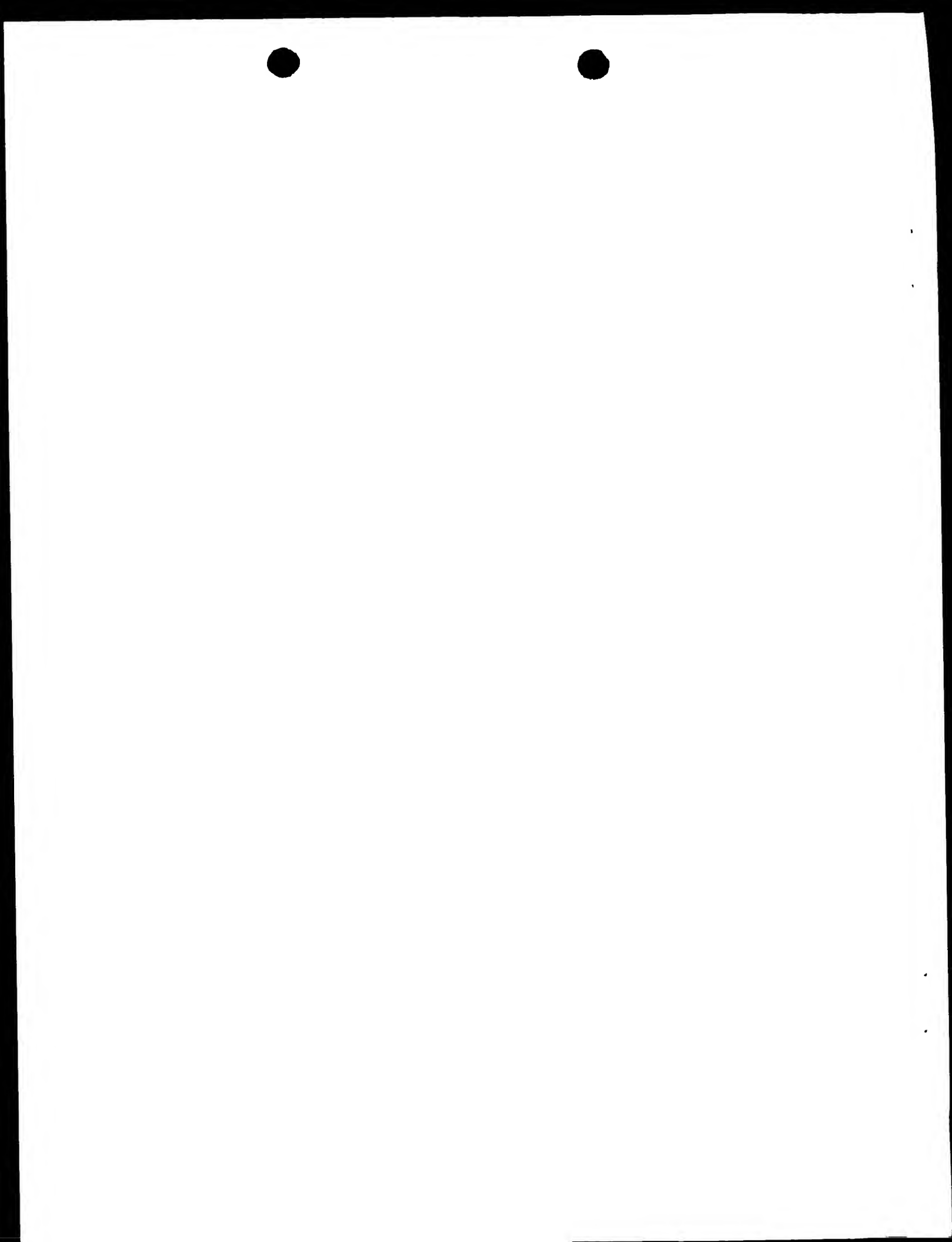


Figure 4





Figur 5



6/7

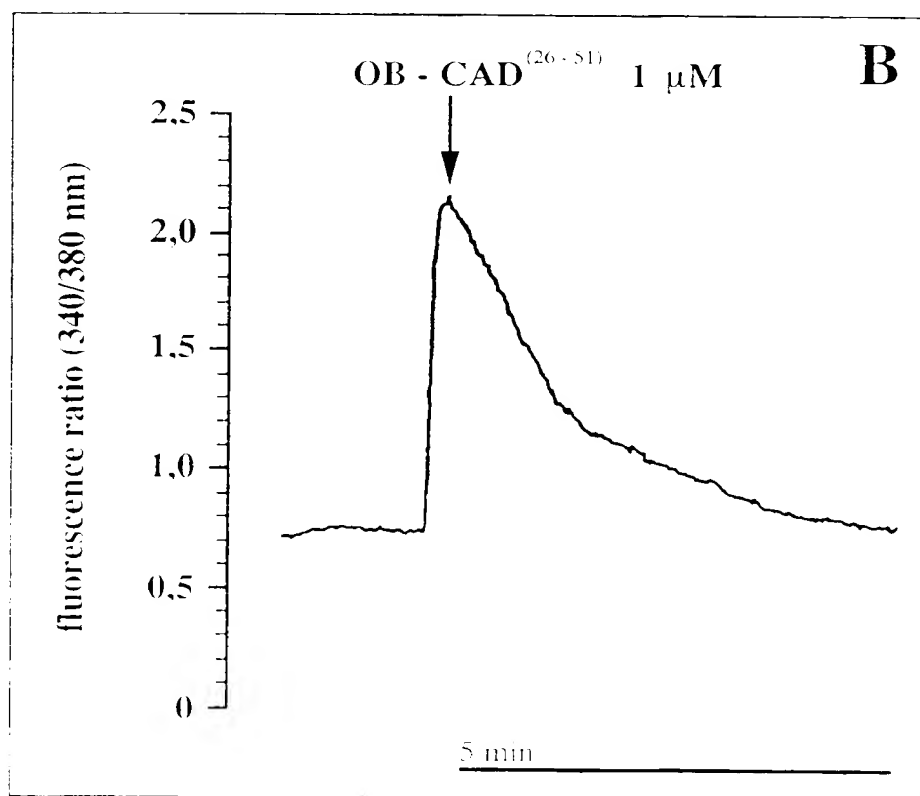
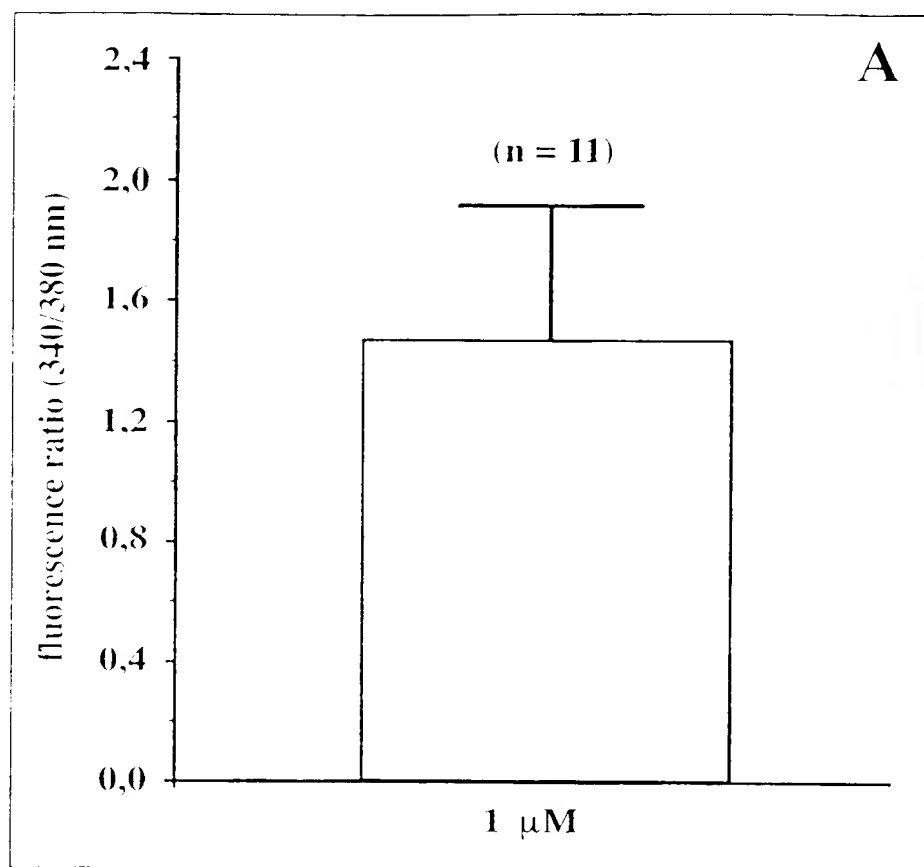
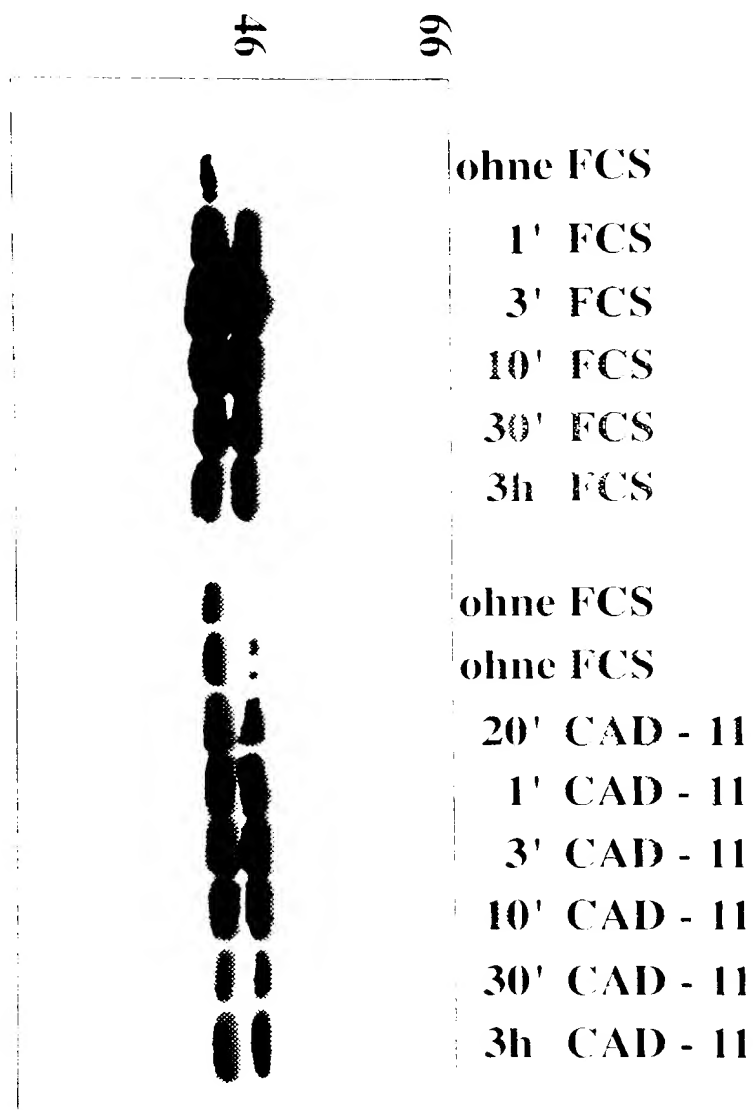
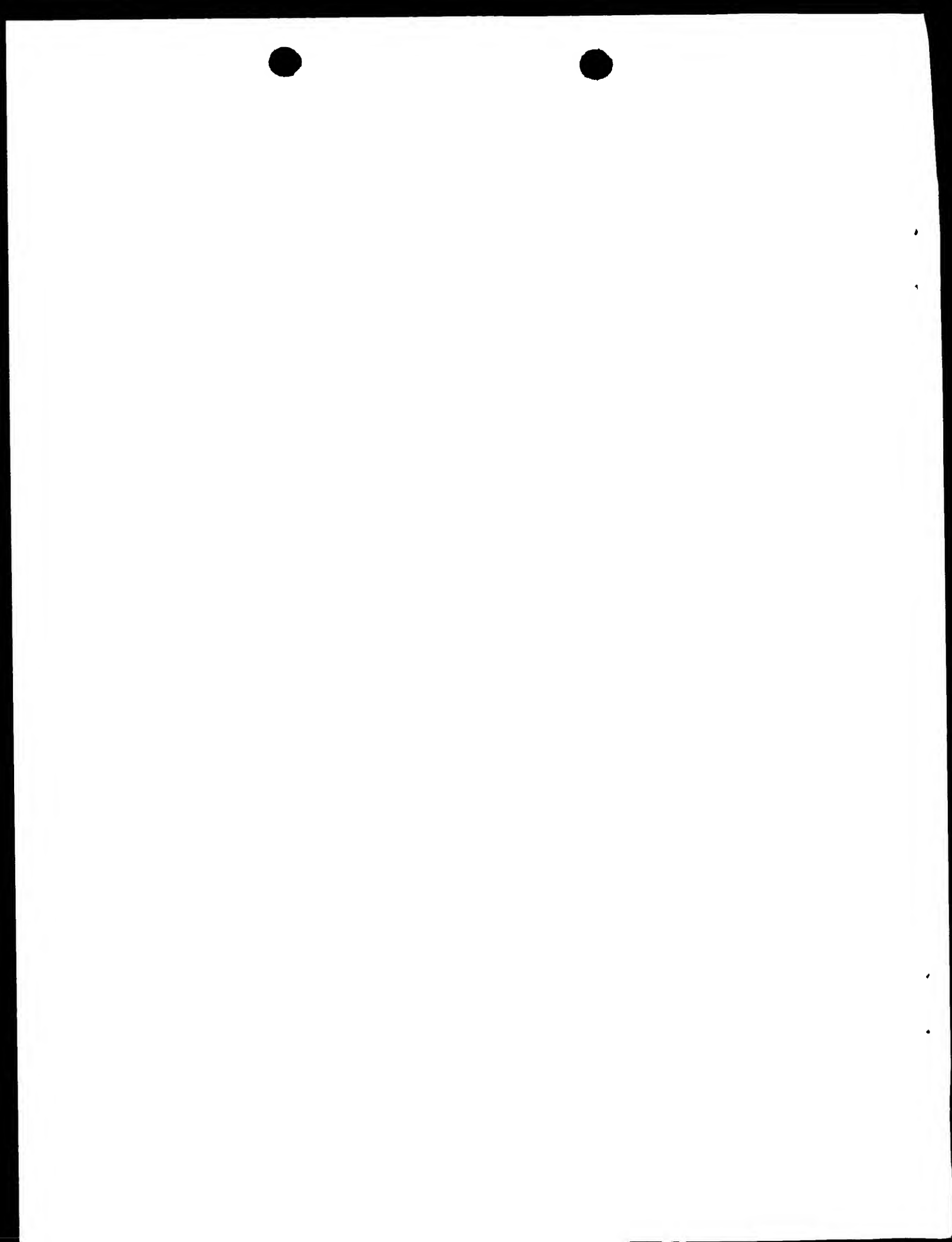


FIGURE 6
ERSATZBLATT (REGEL 26)





Figur 7



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (D) LAND: Deutschland
- (E) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Cadherin derived growth factor
und seine Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANCFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

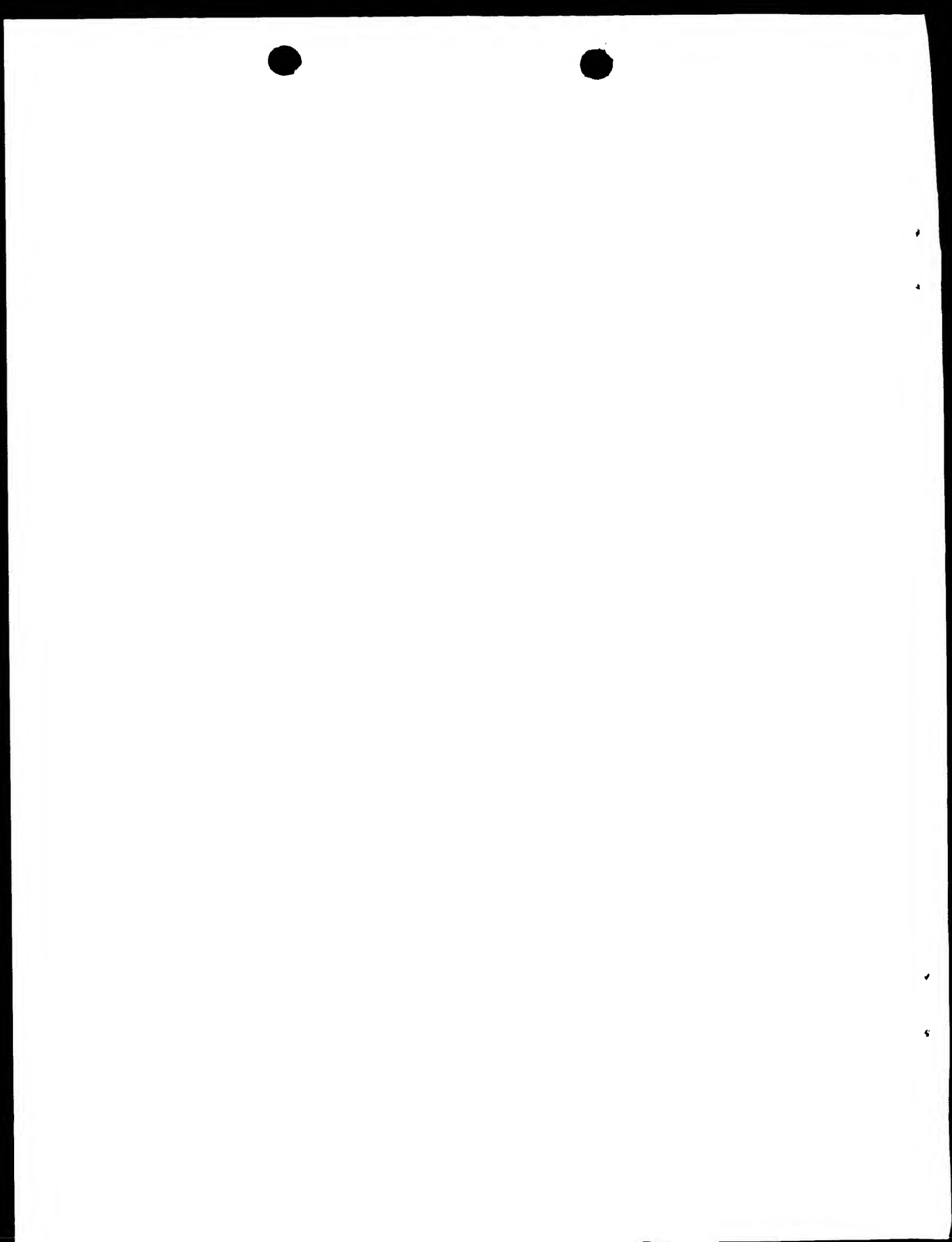
Cys His Pro Gly Phe Asp Ala Glu Ser Tyr Thr Phe Thr Val Pro Arg
1 5 10 15

Arg His Leu Glu Arg Gly Arg Val Leu Gly Arg Val Asn Phe Cys Thr
20 25 30

Gly Arg Gln Arg Thr Ala Tyr Phe Ser Leu Asp Thr Arg Phe Lys Val
35 40 45

Gly Thr Asp Gly Val Ile Thr Val Lys Arg Pro Leu Arg Phe His Asn
50 55 60

Pro Gln Ile His Phe Leu Val Tyr Ala Trp Asp Ser Thr Tyr Arg Lys





Glu Ile Val Phe Pro Arg Gln Phe Ser Lys His Ser Gly His Leu Gln
 115 120 125

Arg Gln Lys Arg
 130

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- A) LANGE: 78 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Cys Arg Ala Val Phe Arg Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Glu Gln Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Gln
 20 25 30

Glu Pro Ala Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn
 35 40 45

Gly Glu Thr Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu
 50 55 60

Lys Ile Phe Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg
 65 70 75

(3) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

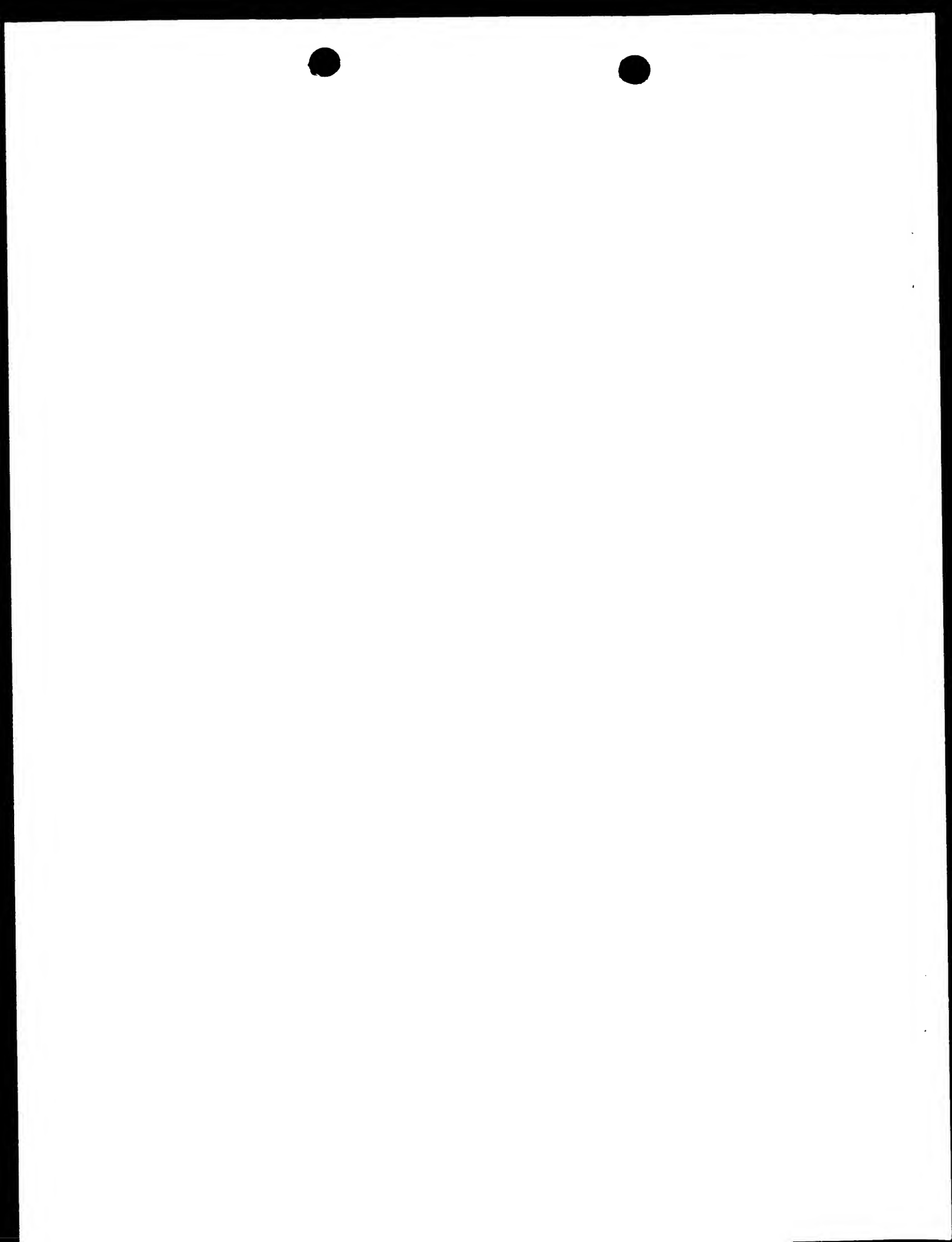
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 144 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

His Asn Glu Asp Leu Thr Thr Arg Glu Thr Cys Lys Ala Gly Phe Ser
 1 5 10 15



Glu Asp Asp Tyr Thr Ala Leu Ile Ser Gln Asn Ile Leu Glu Gly Glu
20 25 30

Lys Leu Leu Gln Val Lys Ser Ser Cys Val Gly Thr Lys Gly Thr Gln
35 40 45

Tyr Glu Thr Asn Ser Met Asp Phe Lys Gly Ala Asp Gly Thr Val Phe
50 55 60

Ala Thr Arg Glu Leu Gln Val Pro Ser Glu Gln Val Ala Phe Thr Val
65 70 75 80

Thr Ala Trp Asp Ser Gln Thr Ala Glu Lys Trp Asp Ala Val Leu Val
85 90 95

Ala Gln Thr Ser Ser Pro His Ser Gly His Lys Pro Gln Lys Gly Lys
100 105 110

Lys Val Val Ala Leu Asp Pro Ser Pro Pro Pro Lys Asp Thr Leu Leu
115 120 125

Pro Trp Pro Gln His Gln Asn Ala Asn Gly Leu Arg Arg Arg Lys Arg
130 135 140



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LANGE: 22 Aminosäuren

(B) AAT: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(H1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ala Gly Ala Asn Pro Ala Gln Arg Asp Thr His Ser Leu Leu Pro Thr
1 5 10 15

His Arg Arg Gln Lys Arg
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LANGE: 35 Aminosäuren

(E) APT: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu Asn Arg
20 25 30

Ser Lys Arg
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

1.2 SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) APT: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(21) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

CH-1 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:



Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu Asn Arg
 20 25 30

Ser

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 54 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKULS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Leu Leu Asp Leu Trp Thr Pro Leu Ile Ile Leu Trp Ile Thr Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Cys Ile Tyr Met Ala Pro Met Asn Gln Ser Gln Val Leu Met
 20 25 30

Ser Gly Ser Pro Leu Glu Leu Asn Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Ile
 35 40 45

Leu Asn Arg Ser Lys Arg
 50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 31 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKULS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His
 1 5 10 15



His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys Arg
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys
1 5 10 15

Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Gln Pro Gln Pro Gln Gln Thr Leu Ala Thr Glu Pro Arg Glu Asn Val
1 5 10 15

Ile His Leu Pro Gly Gln Arg Ser His Phe Gln Arg Val Lys Arg
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:



Gln Pro Gln Pro Gln Gln Thr Leu Ala Thr Glu Pro Arg Glu Asn Val
 1 5 10 15

Ile His Leu Pro Gly Gln Arg Ser His Phe Gln Arg Val
 20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 129 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Glu Asp Leu Asp Cys Thr Pro Gly Phe Gln Gln Lys Val Phe His Ile
 1 5 10 15

Asn Gln Pro Ala Glu Phe Ile Glu Asp Gln Ser Ile Leu Asn Leu Thr
 20 25 30

Phe Ser Asp Cys Lys Gly Asn Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Val Ser Ser
 35 40 45

Pro Tyr Phe Lys Val Asn Ser Asp Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Asn
 50 55 60

Ile Thr Ala Val Gly Lys Thr Leu Phe Val His Ala Arg Thr Pro His
 65 70 75 80

Ala Glu Phe Asp Met Ala Glu Leu Val Ile Val Gly Gly Lys Asp Ile
 85 90 95

Ser Leu Gln Asp Ile Phe Lys Phe Ala Arg Thr Ser Pro Val Pro Arg
 100 105 110

Gln Lys Arg Pro Ser Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Ala Cys
 115 120 125

Leu



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

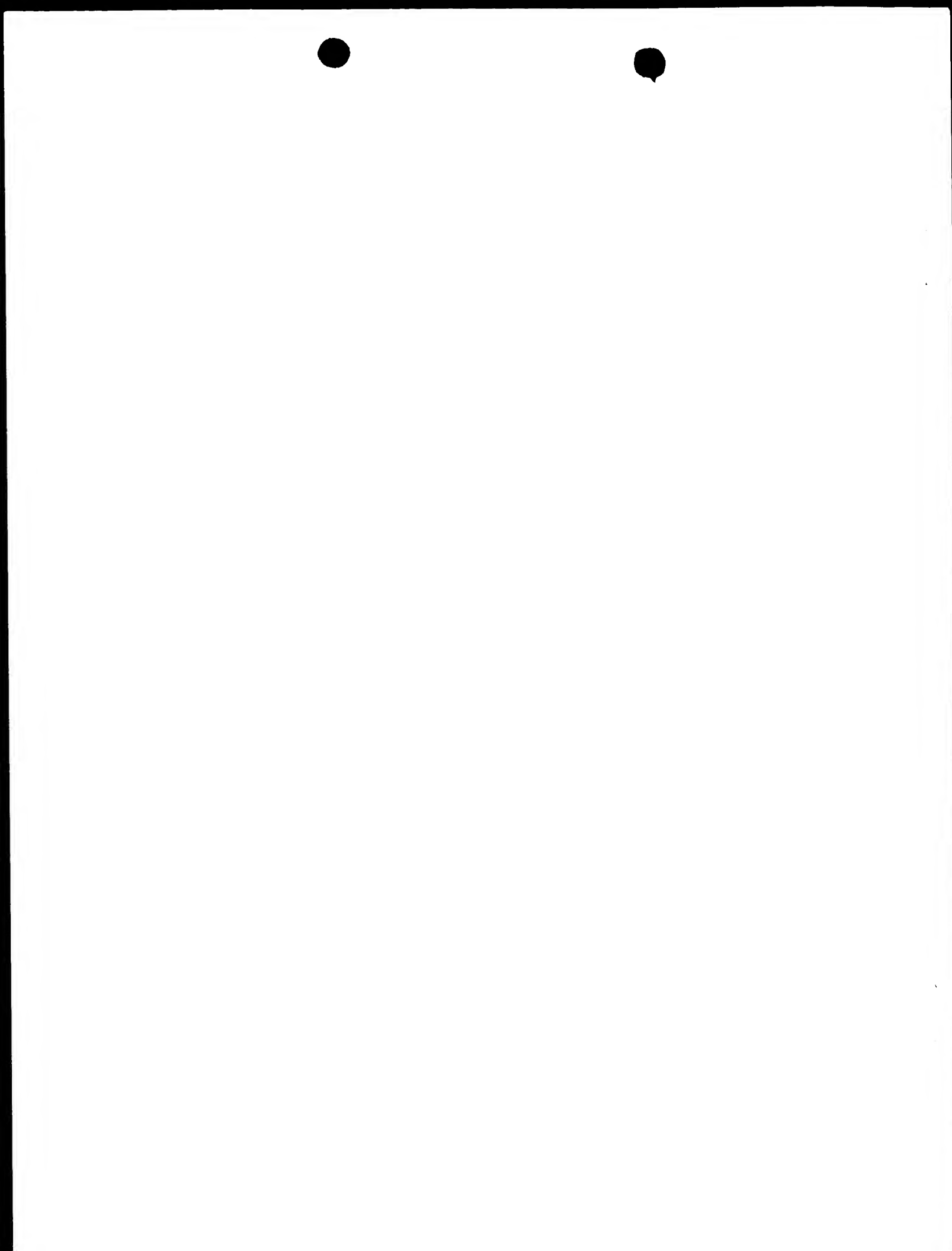
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Val Pro Gly Trp Arg Arg Pro Thr Thr Leu Tyr Pro Trp Arg Arg Ala
1 5 10 15

Pro Ala Leu Ser Arg Val Arg Arg Ala Trp Val Ile Pro Pro Ile Ser
20 25 30

Val Ser Glu Asn His Lys Arg
35

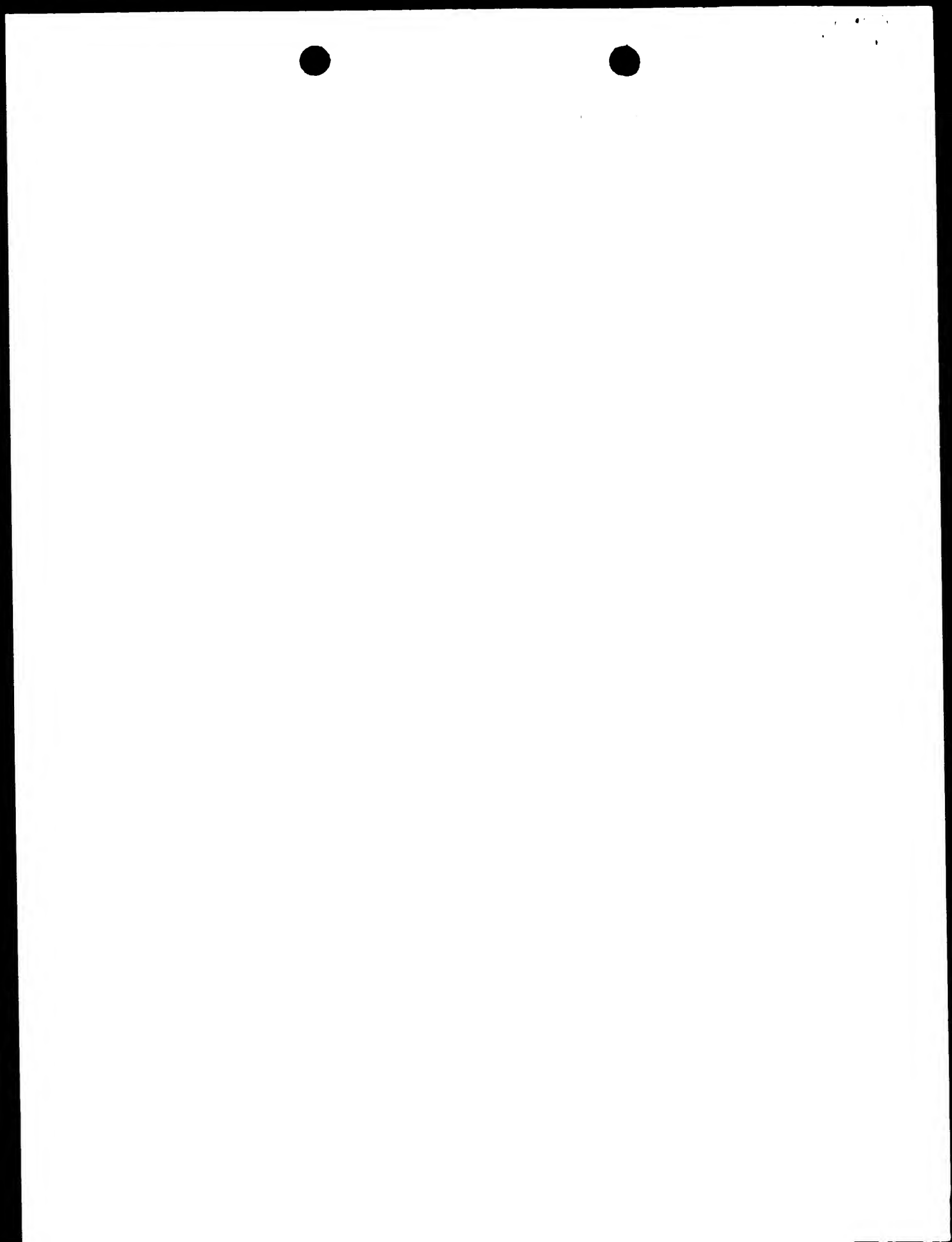


REPLACED BY
ART 34 AMDT

- 21 -

CLAIMS:

1. A peptide referred to as cadherin-derived growth factor (CDGF) the sequence of which corresponds to a partial sequence of a pre-pro-cadherin, said pre-pro-cadherin comprising the domains signal sequence, pro sequence, cadherin repeats, transmembrane region and intracellular domain, characterized in that the sequence of said peptide comprises the pro sequence, that at least one of the other domains of the pre-pro-cadherin is lacking, and that said peptide has cell-proliferative, cell-protective and/or cell-differentiating properties.
2. The CDGF according to claim 1, characterized in that said CDGF has a cell-proliferative effect on primary osteoblasts from rat calvarias.
3. The CDGF according to claim 1 and/or 2, characterized in that said CDGF has a cell-protective and/or cell-differentiating effect on primary nerve cell cultures from spinal ganglia of chicken embryos.
4. The CDGF according to at least one of claims 1 to 3, characterized in that said CDGF is a fragment of pro-cadherin.
5. The CDGF according to at least one of claims 1 to 4, characterized by being the peptide cleaved off during the processing of pro-cadherin into cadherin, or a fragment thereof.
6. The CDGF according to at least one of claims 1 to 5, characterized in that said CDGF comprises no cadherin repeats.



7. A CDGF having the sequence

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFVPRRHLEGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGCVIT-
VKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFP-
NSSPSLRQKE

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVVQYESSEPADF-
KVDEDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEVE--
EIVFPRQFSKHSGHLQRQKR

Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREAQVTLTLEAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDNDFFTNRNGETVQER-
RSLKERNPLKIFPSKRILRRHKKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTTRETCKAGFSEDDYTALISQNILEGKLLQVKSSCVGKGTQYETNSMD-
FKGADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWDAVLVAQTSSPHSGHKPQKGK-
KVVALDPSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRRQKR

Cadherin-6 human (19-53):

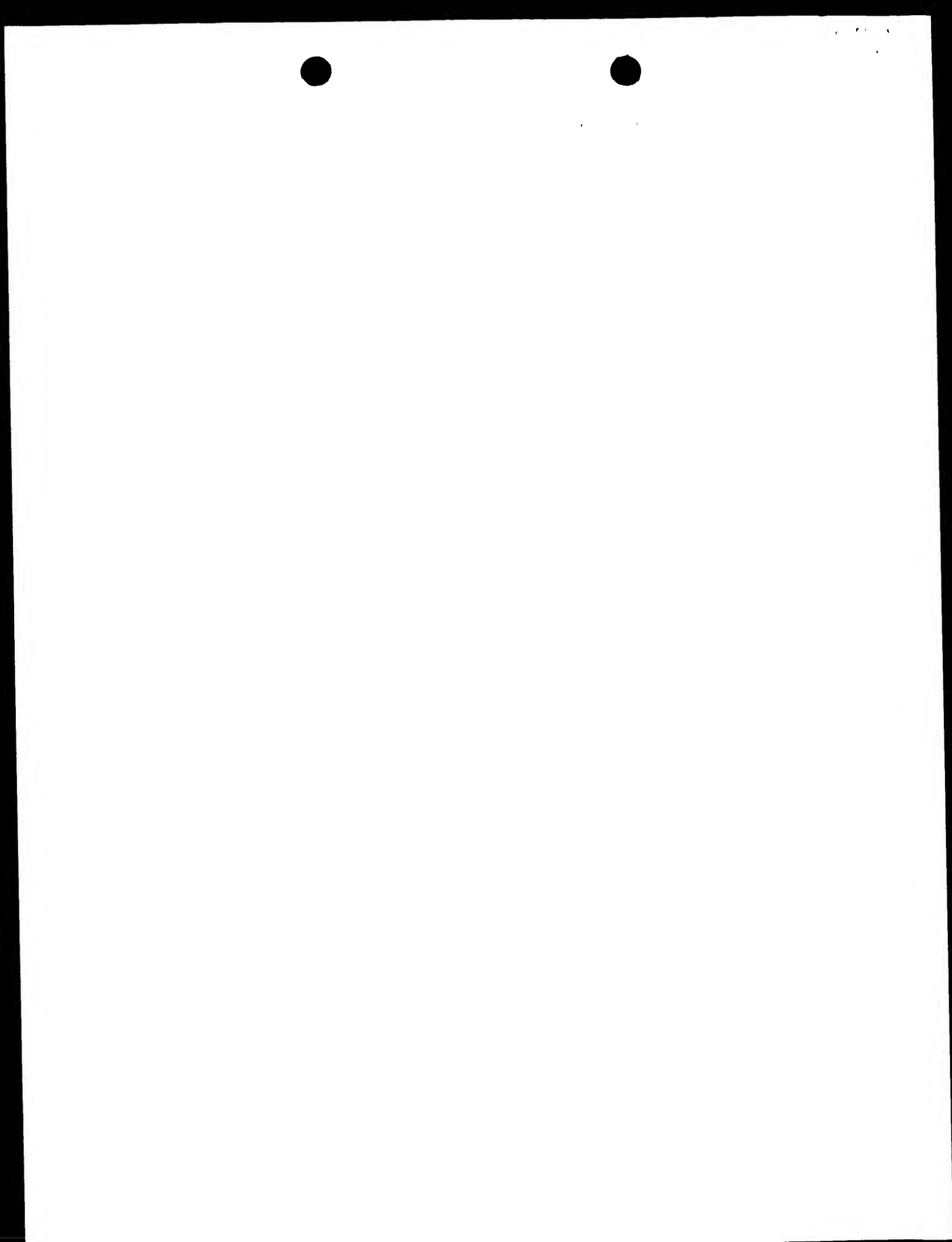
TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMSGSPLELNSLGEEQRIILNRSKR



Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):
FAPERPGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

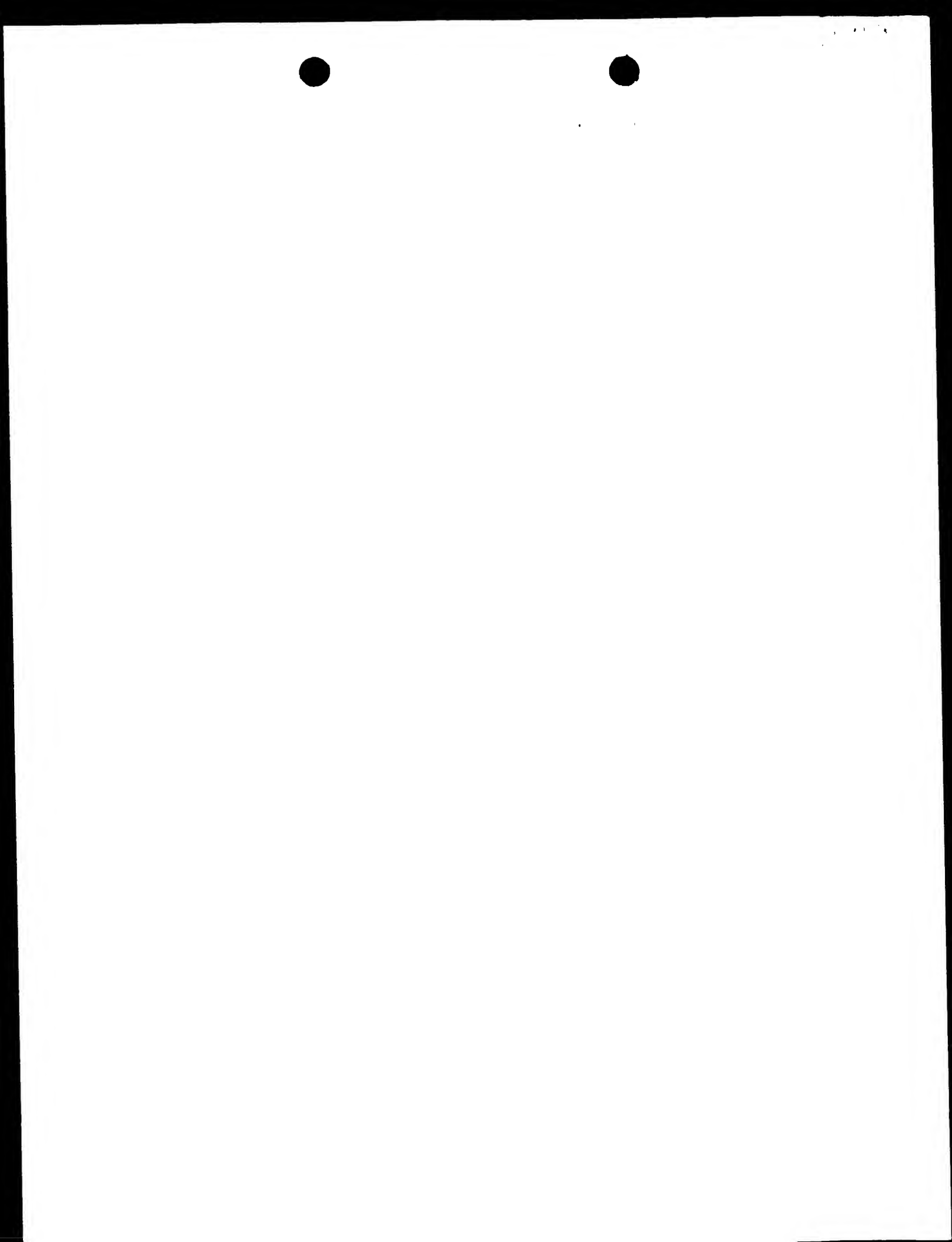
Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-54):
QPQPQOTLATEPRENVIHLPGQRSHFQVRKR

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-52):
QPQPQOTLATEPRENVIHLPGQRSHFQVR

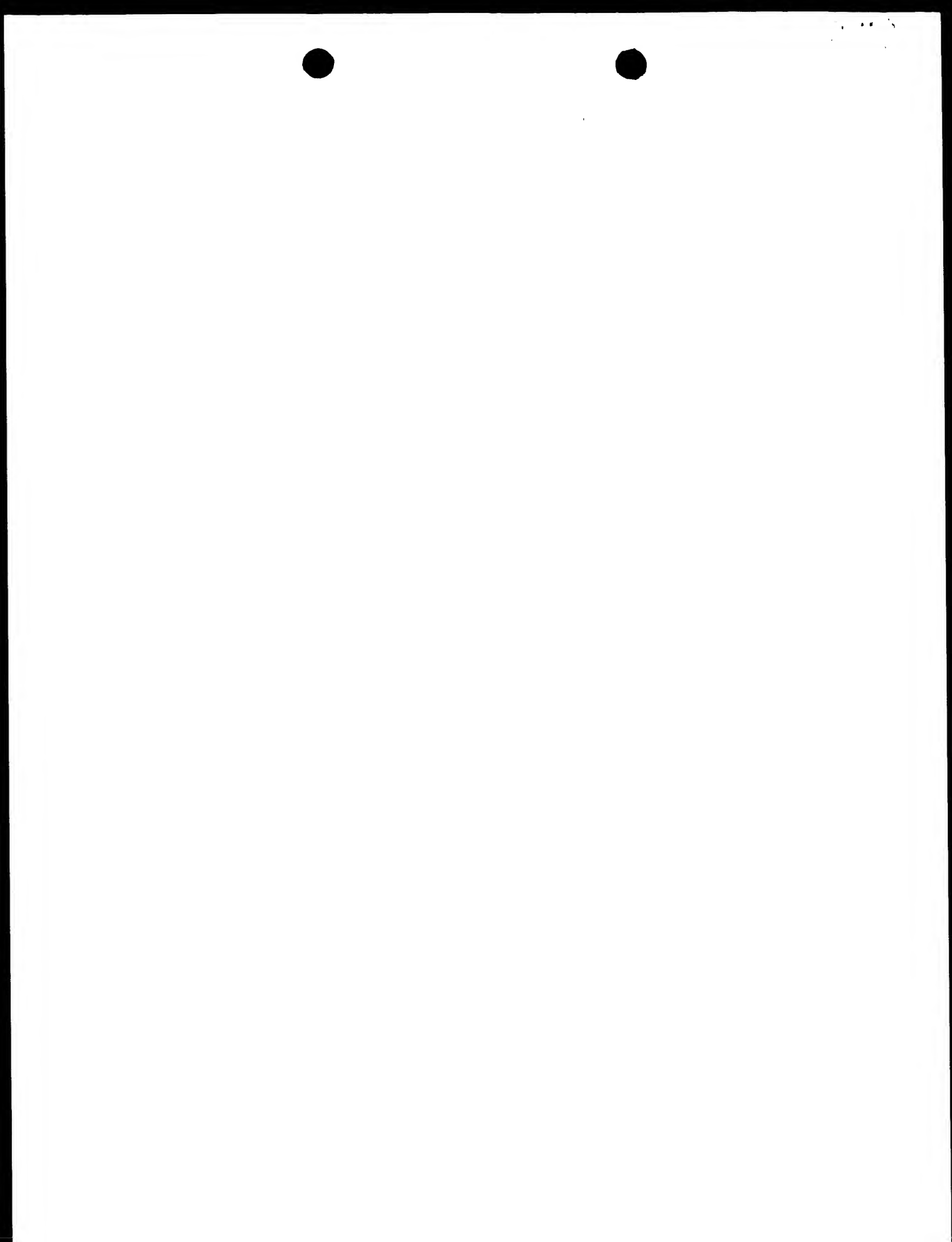
Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):
EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSDCKGNDKLRYEVSSPYFKVNS-
DGGLVALRNITAVGKTLFVHARTPHAEFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPR-
QKRPSVLLLSLFLSLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):
VPGWRKPPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPISVSENHKR

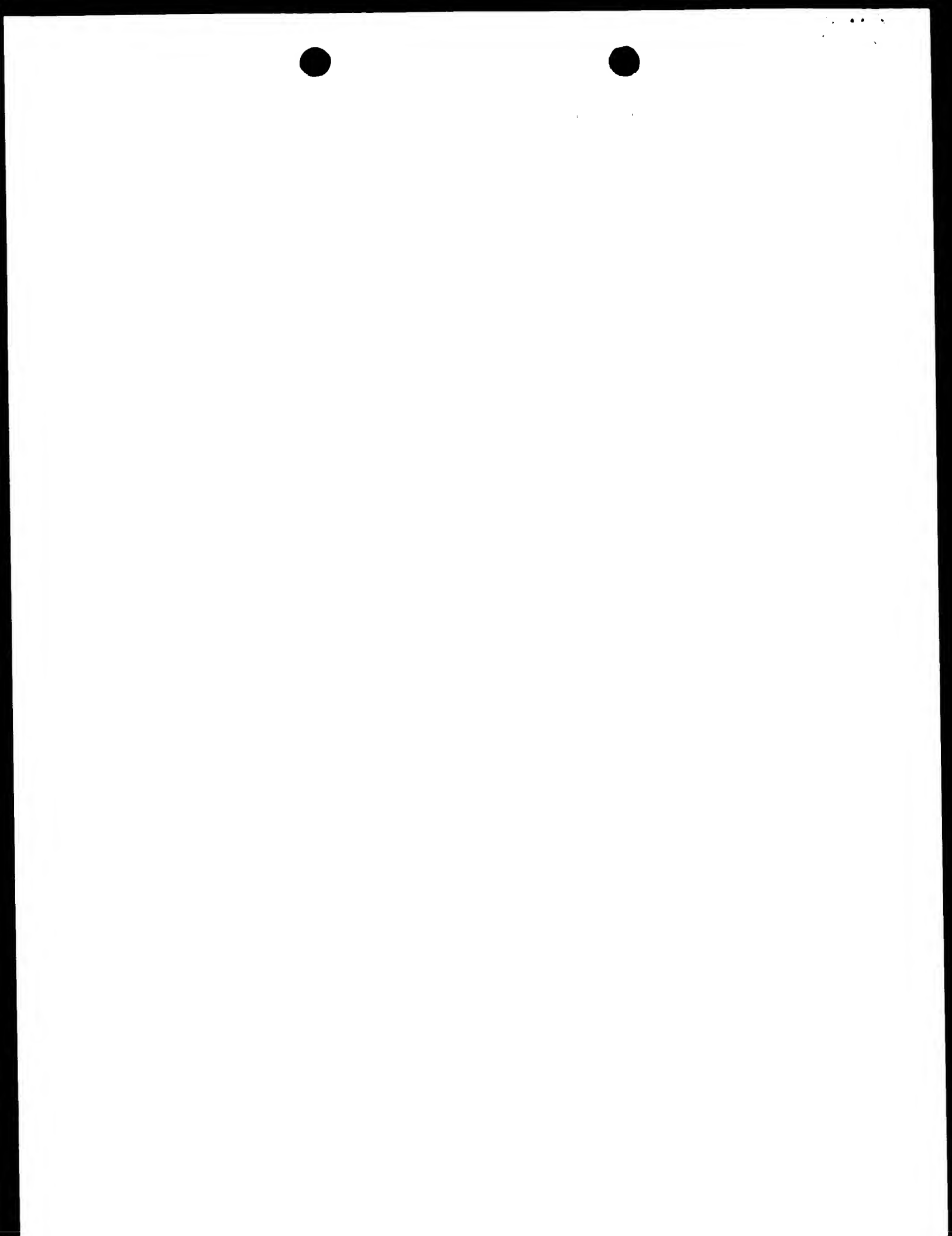
8. Variants of CDGF, characterized by being allelic variations of the CDGFs or peptides generated by in vitro mutagenesis whose biological and/or immunological activities correspond to those of the CDGFs.
9. Compounds, characterized by containing CDGF or derivatives thereof according to claims 1 to 8 and having cell-proliferative, cell-protective and/or cell-differentiating properties.
10. Nucleic acids coding for CDGF according to any of claims 1 to 7, variants according to claim 8 or a compound according to claim 9.



11. A nucleic acid, characterized by being complementary to the nucleic acid according to claim 10.
12. A nucleic acid according to claim 10 or 11, characterized by being DNA, RNA, PNA or nuclease-resistant analogues thereof.
13. Vectors containing nucleic acids according to at least one of claims 10 to 12.
14. Antibodies, characterized by being directed against CDGF according to any of claims 1 to 7, a variant according to claim 8 or a compound according to claim 9.
15. An antagonist/inhibitor, characterized by being directed against CDGF according to any of claims 1 to 7, a variant according to claim 8, a compound according to claim 9 or a nucleic acid according to any of claims 10 to 12.
16. A medicament containing CDGF according to any of claims 1 to 7, a variant according to claim 8, compounds according to claim 9, nucleic acids according to at least one of claims 10 to 12, antibodies according to claim 14 and/or antagonist/inhibitors according to claim 15 together with usual auxiliary agents.
17. A diagnostic agent containing CDGF according to any of claims 1 to 7, a variant according to claim 8, a compound according to claim 9, a nucleic acid according to at least one of claims 10 to 12, antibodies according to claim 14 and/or antagonist/inhibitors according to claim 15 together with usual auxiliary agents.

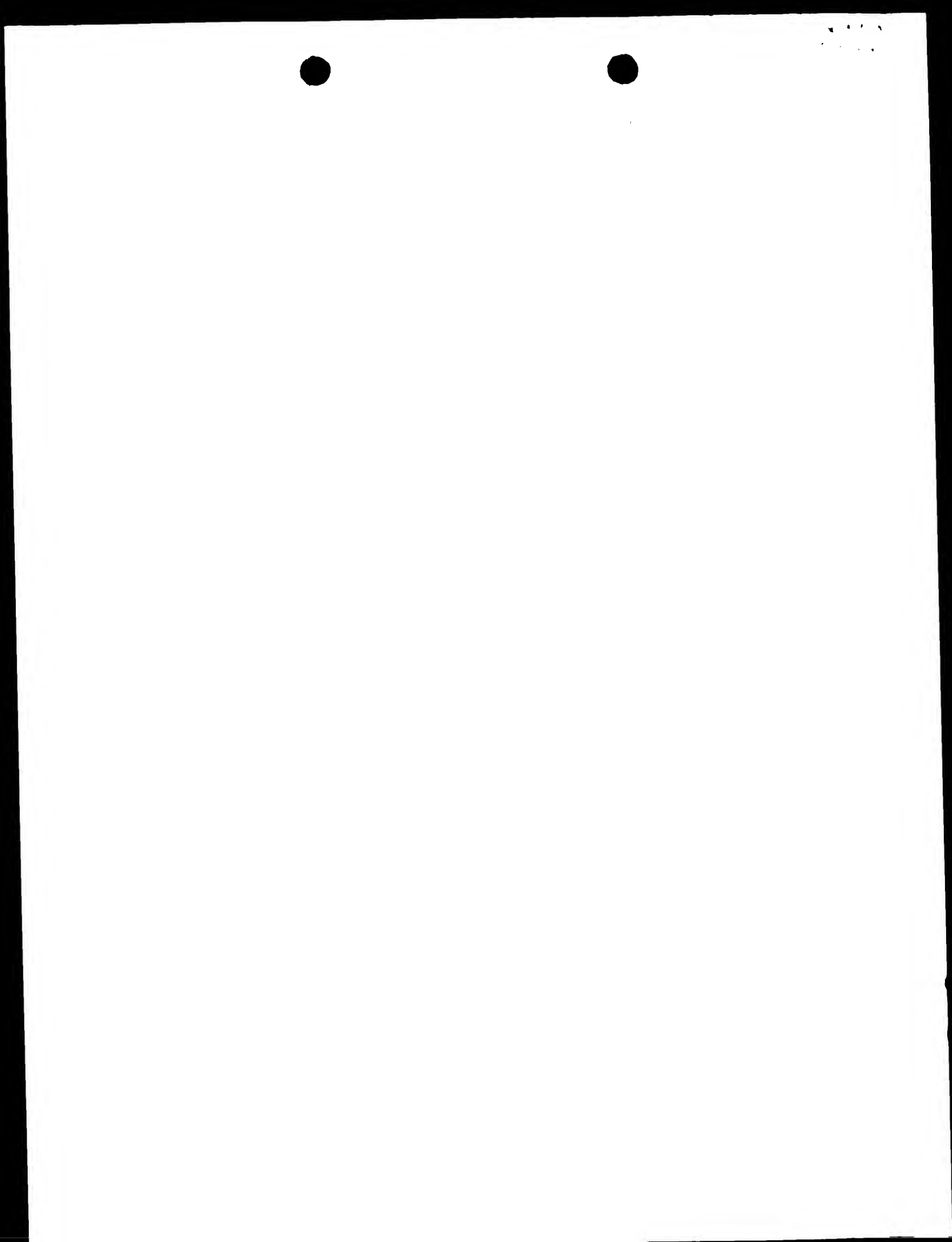


18. The medicament according to claim 16 in suitable galenic formulations for oral, intravenous, intramuscular, intracutaneous, intrathecal administrations, and as an aerosol for transpulmonary administration.
19. Use of the medicaments according to claim 16 or 18 for the treatment and prophylaxis of degenerative and metabolic diseases of the bones, such as osteoporosis, osteomalacia and osteopenia, of the pancreas, such as diabetes mellitus, of the muscles, such as muscular dystrophies, of the vessels, of the central and peripheral nervous systems, such as peripheral and central neuropathies, of the lungs, such as bronchial asthma, of the stomach, such as ulcer, and for the therapy and prophylaxis of inflammatory processes, disturbed inflammatory reactions, tumor diseases, and for wound and bone healing.
20. Use of the diagnostic agent according to claim 17 for checking CDGF levels in tissues, in secretions and/or in body fluids, such as plasma, urine and cerebrospinal fluid.
21. Use of the diagnostic agent according to claim 17 as a marker for functional disorders in bones, muscles, vessels, the nervous system, lymph organs, the gastrointestinal tract, the immune system, and of diabetes and inflammatory and neoplastic processes, and as a tumor marker.
22. A process for the preparation of CDGF according to at least one of claims 1 to 7, variants according to claim 8 or a compound according to claim 9 from hemofiltrate
 - using cation-exchange extraction followed by elution of the adsorbed substances, renewed cation-exchange chromatogra-



phy of the extract containing the peptides, and multistage reversed-phase chromatography; or

- by solid-phase synthesis in terms of Merrifield synthesis, or liquid-phase synthesis according to methods involving protected amino acids, per se known to those skilled in the art, followed by purification; or
- by methods of heterologous expression, per se known to those skilled in the art, using common biotechnological vectors.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

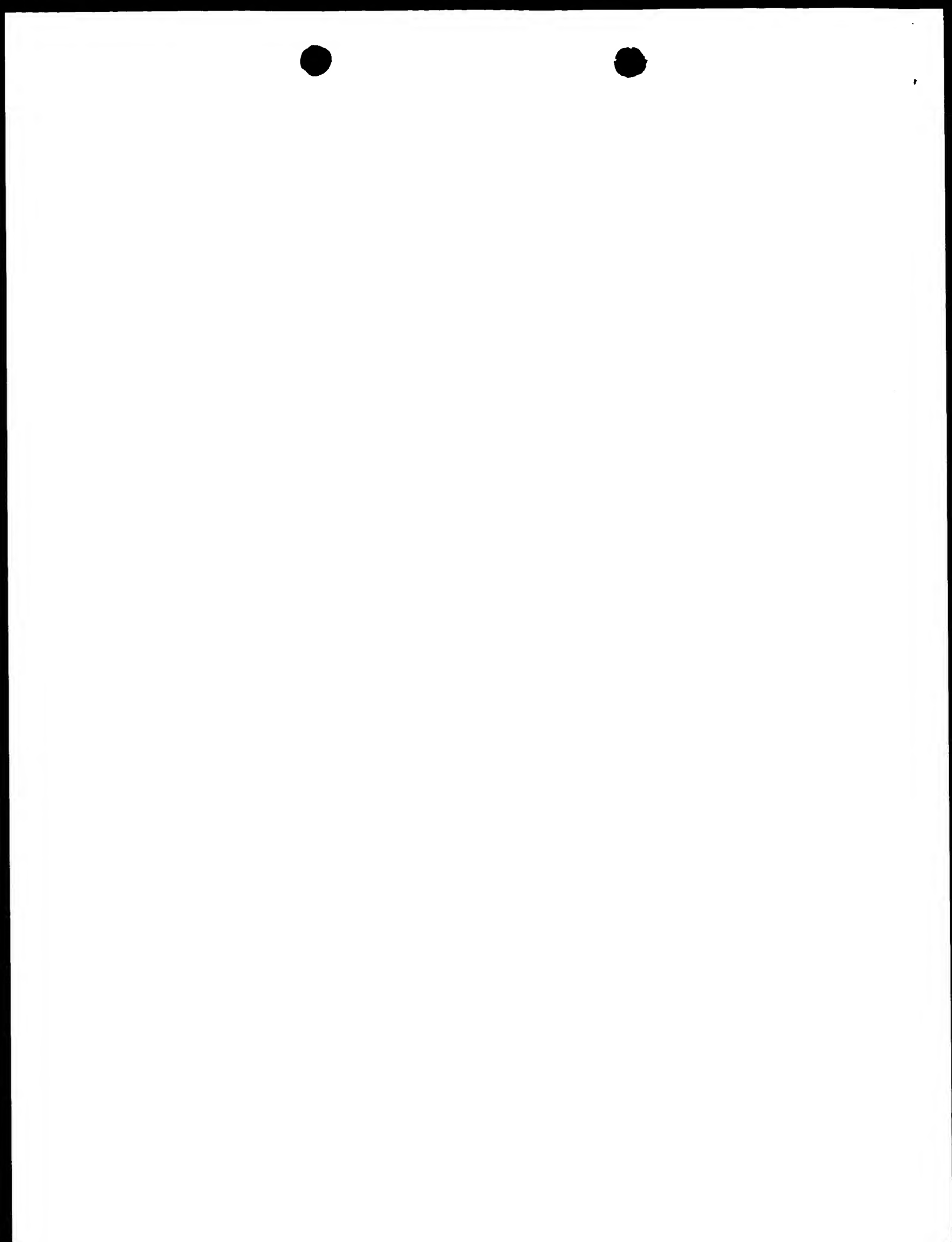
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 982066wo Me/Sch-gn	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06547	International filing date (<i>day month year</i>) 15 October 1998 (15.10.98)	Priority date (<i>day month year</i>) 15 October 1997 (15.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/475, 16/22		
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 May 1999 (07.05.99)	Date of completion of this report 20 January 2000 (20.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06547

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments*)

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1 - 28, as originally filed.
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1 - 14, filed with the letter of 06 December 1999 (06.12.1999),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/7 - 7/7, as originally filed.
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Box



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EE/94/000000

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of I.3

1. The amendments filed with the letter of 06.12.99 introduce substantive matter which goes beyond the disclosure in the international application as filed, in contravention of PCT Article 34(2)(b). This applies to the amendment of the sequence of "cadherin-D human (cadherin 13) (23-138)" in Claim 4. In the opinion of the International Preliminary Examining Authority, this is not an obvious error. The application as originally filed does not appear to disclose that the sequence indicated in the proposed rectification was envisaged. Nor is the proposed rectification clearly indicated in document D3 (CELL ADHESION AND COMMUNICATION (1994) 2: 15 - 26), because the sequence indicated in Figure 5 of that document also differs from that of the application at other positions of the sequence range 23 - 138. The above-mentioned amendment was therefore disregarded for the establishment of the present report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No
PCT 83 44 444

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 12, 14	YES
	Claims	13, 13	NO

2 Citations and explanations

2. The peptides of Claims 1 - 4 are considered to be novel, because they are shorter than the pre-pro-peptides disclosed in D3 (Figures 1 - 7) by the N-terminal.

In addition, these peptides appear to involve an inventive step because of their unexpected effect as growth factors. It would not have been obvious to a person skilled in the art to provide the claimed peptides in order to solve the technical problem of providing further peptides which have cell-proliferative, cell-protective and/or cell-differentiating properties,. Consequently, Claims 5 - 14 are also novel and inventive.

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY

The PCT does not contain clear-cut criteria for assessing the industrial applicability of the present Claims 12 and 13. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a

.../...



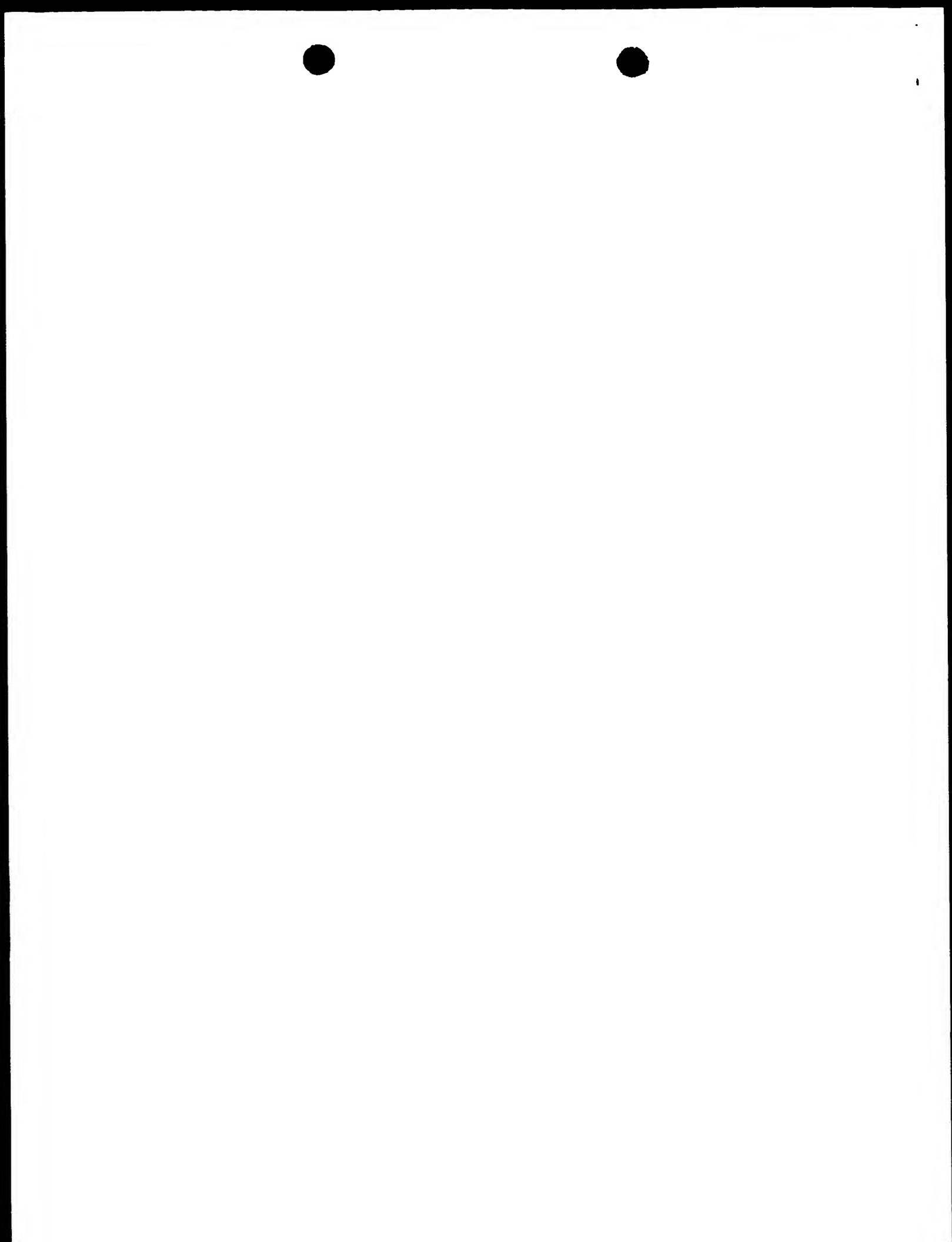
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 94/000001

(Continuation of V.2)

known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

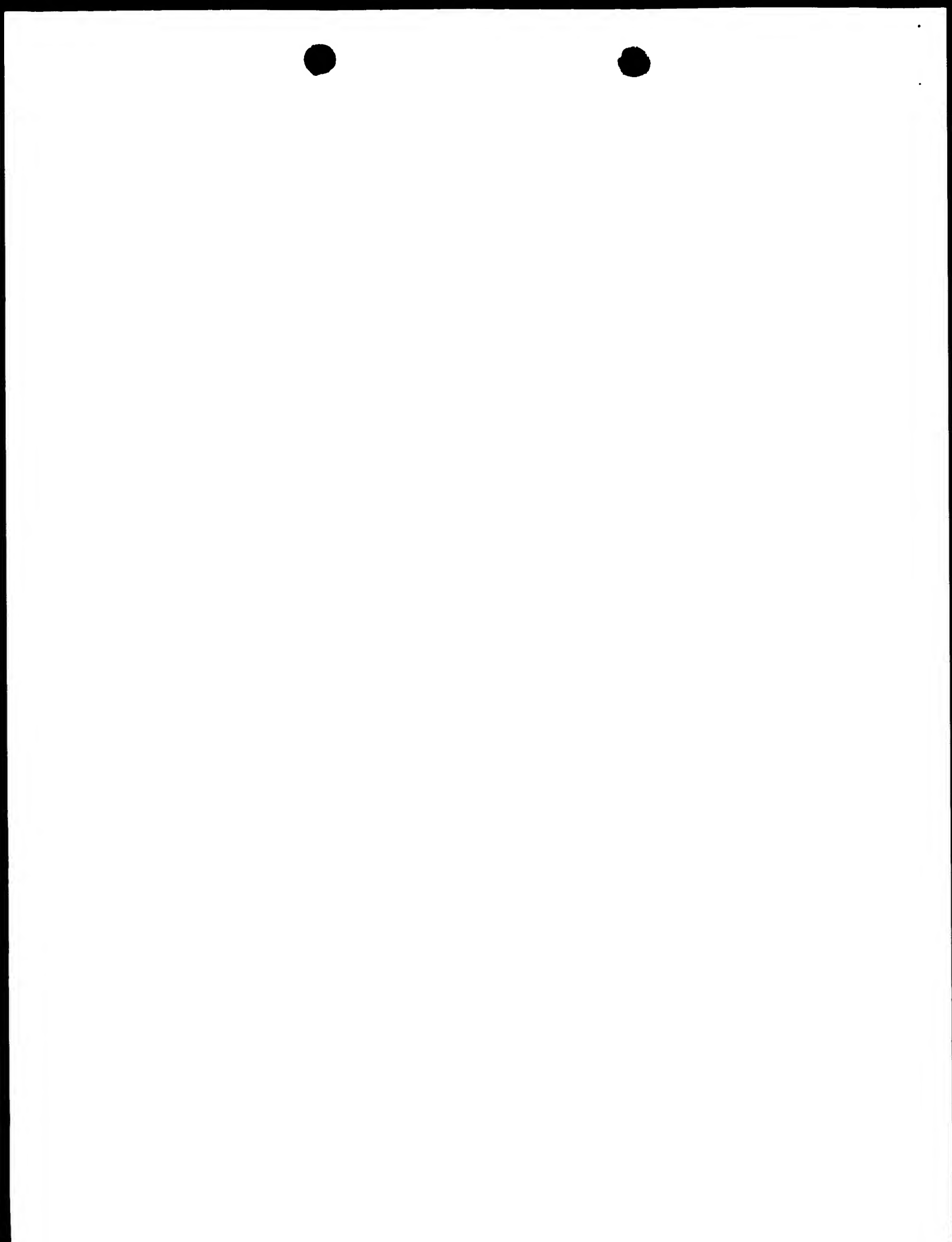
International application No.

FILED 45 1994

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made

4. The expression "in that the peptide has cell-proliferative, cell-protective and/or cell-differentiating properties" used in Claim 1 is unclear, contrary to PCT Article 6, because the way in which this activity is to be measured is not defined. Investigation of the effect of a particular peptide on all conceivable cell types and cell lines, simply in order to determine whether it falls under the claim, would entail undue effort for a person skilled in the art.
5. Claim 4 appears to contain all the features of Claim 1 and is therefore not correctly worded as a dependent claim dependent on the latter (PCT Rule 6.4).
6. The description is not in line with the claims, contrary to PCT Rule 5.1(a)(iii).



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/06547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 646 250 A (SUZUKI S) 8 July 1997 see examples 2,3 ---	1-3, 10-15
A	EP 0 585 801 A (HOECHST JAPAN LIMITED) 9 March 1994 see examples 5-7; table 1 ---	1,2,7, 10-15
A	HIDENOBU TANIHARA ET AL: "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin" CELL ADHESION AND COMMUNICATION, vol. 2, 1 January 1994, pages 15-26, XP000576845 see figures 1-7 --- -/--	1-3,7, 10-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 1999

Date of mailing of the international search report

16/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

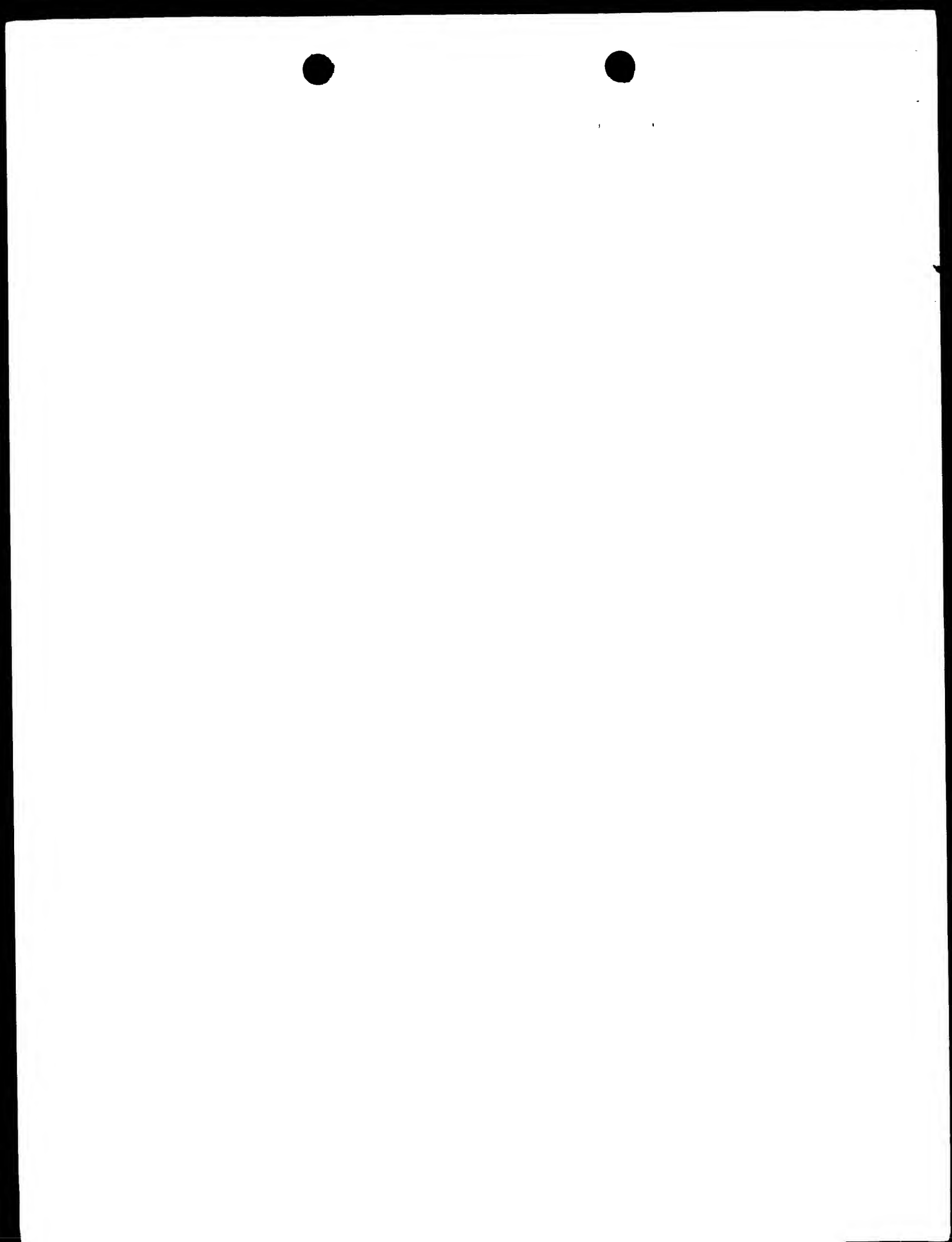
Cupido, M



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/06547

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SELIG S ET AL: "Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated brain-specific cadherin"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>vol. 94, no. 6, 18 March 1997, pages 2398-2403, XP002095155</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>see page 2399, left-hand column, paragraph 3-5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1,3, 10-15</p>



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/ 06547

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

For further information, see form PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

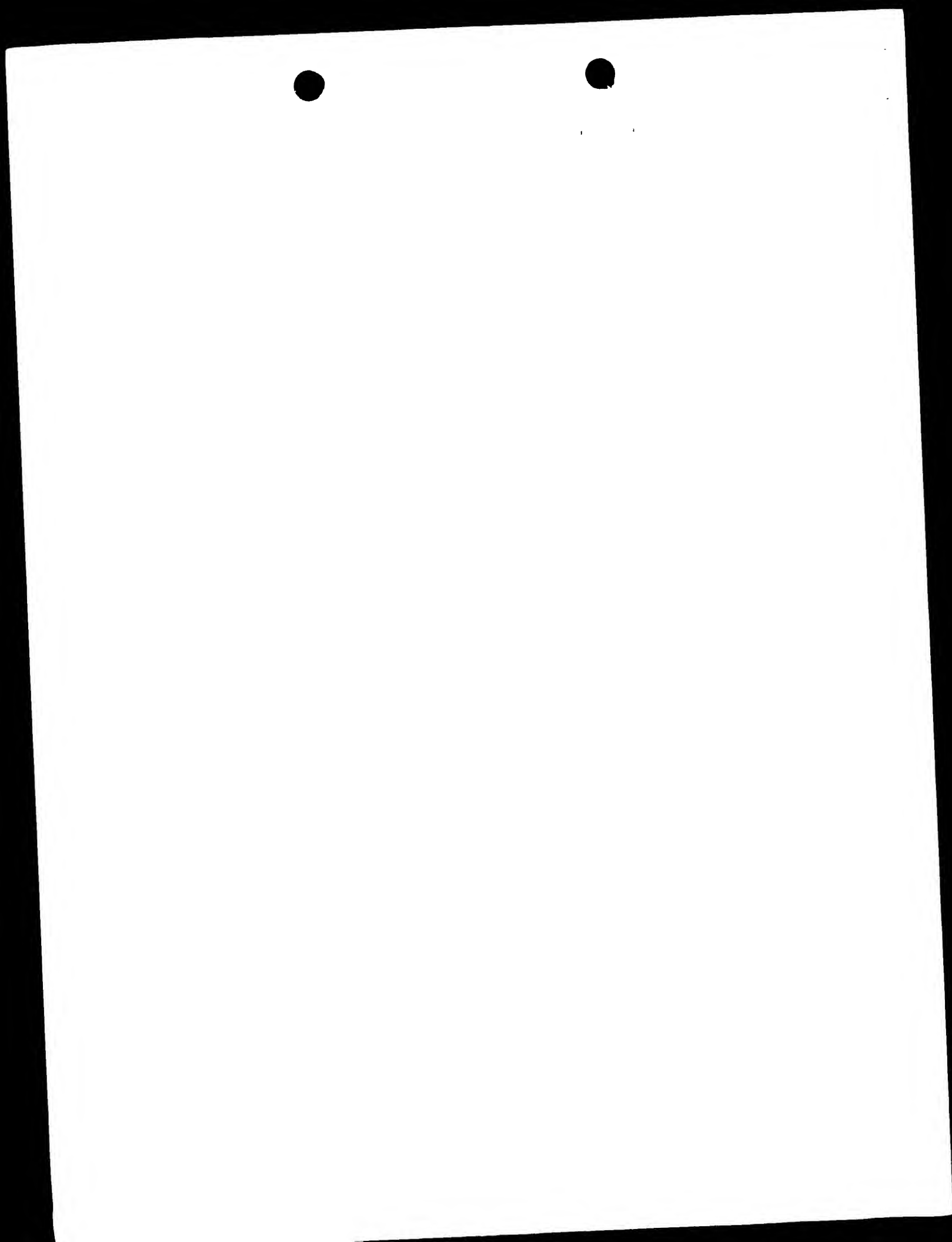
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



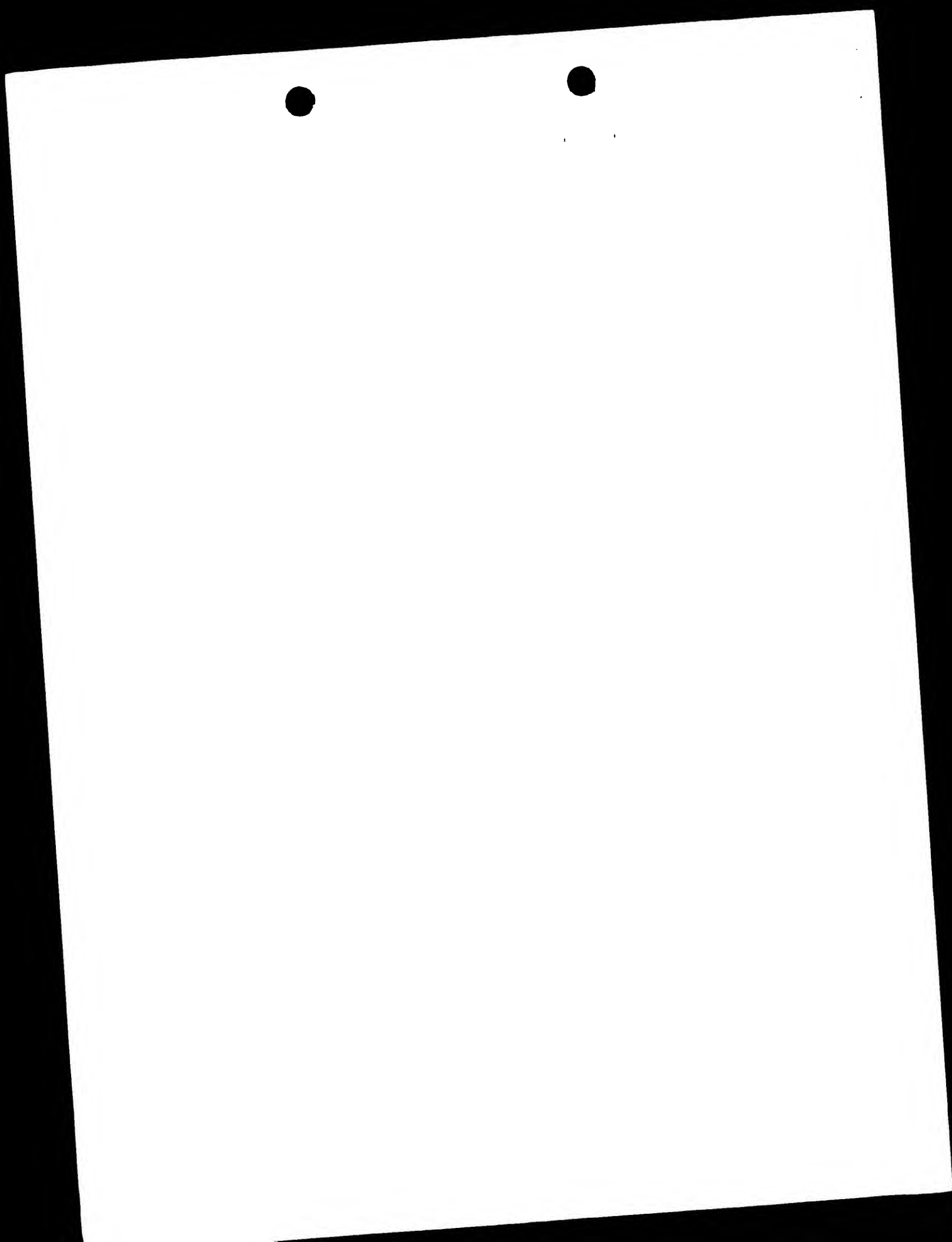
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP98/06547

Although claim 19 relates to a method for treating the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the composition.

Although claims 20 and 21 relate to a method of diagnosis which is carried out on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the composition.



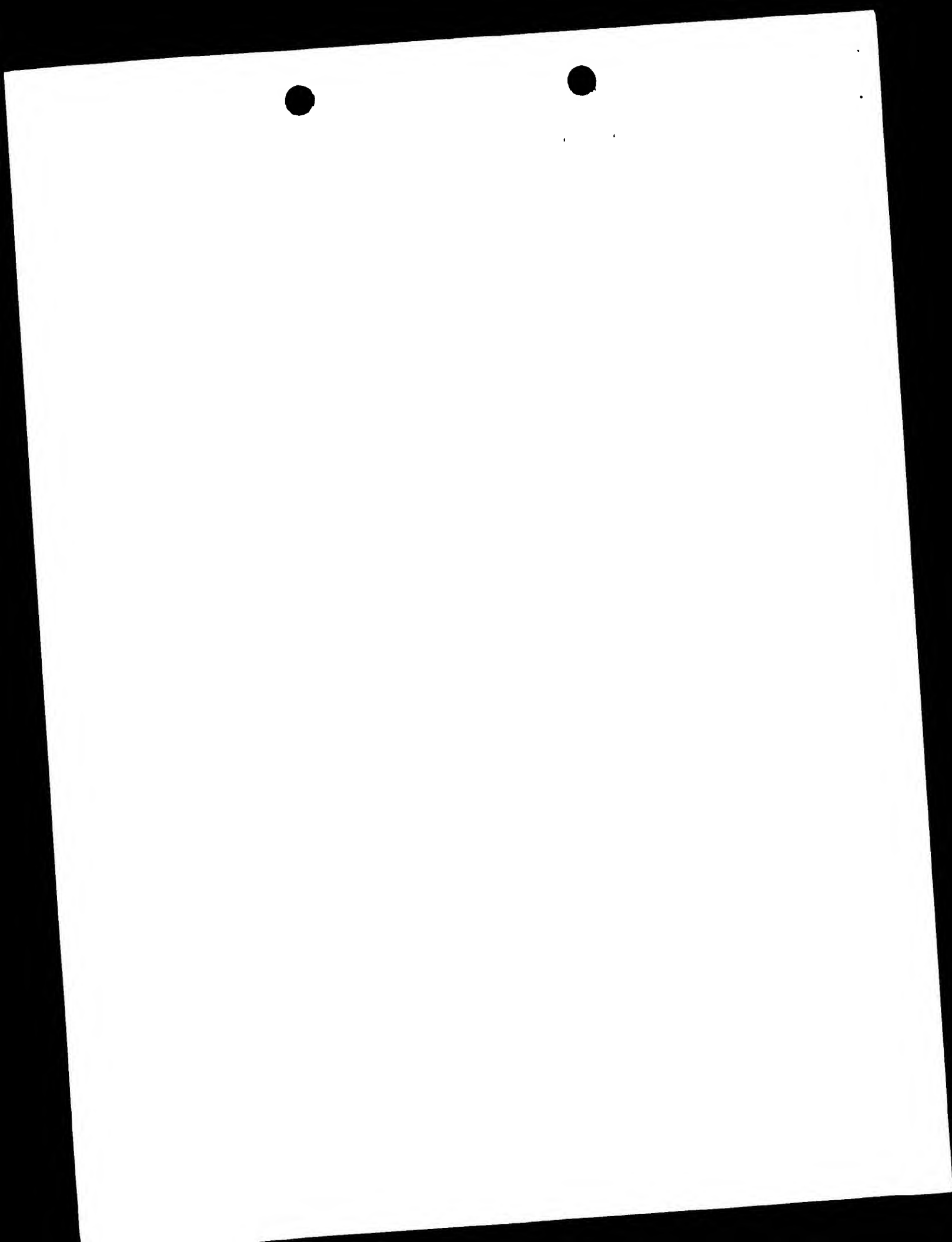
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06547

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5646250	A	08-07-1997	US 5597725 A	28-01-1997
			CA 2111573 A	28-10-1993
			EP 0604603 A	06-07-1994
			JP 7500019 T	05-01-1995
			WO 9321302 A	28-10-1993
			US 5639634 A	17-06-1997
EP 585801	A	09-03-1994	AU 663216 B	28-09-1995
			AU 4492293 A	03-03-1994
			CA 2104997 A	01-03-1994
			JP 6122700 A	06-05-1994
			US 5869638 A	09-02-1999



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/509555

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 982066wo Me	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT ISA 220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/06547	internationales Anmeldedatum (Tag Monat Jahr) 15/10/1998
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag Monat Jahr) 15/10/1997	
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38 2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen; Abb. Nr. 1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



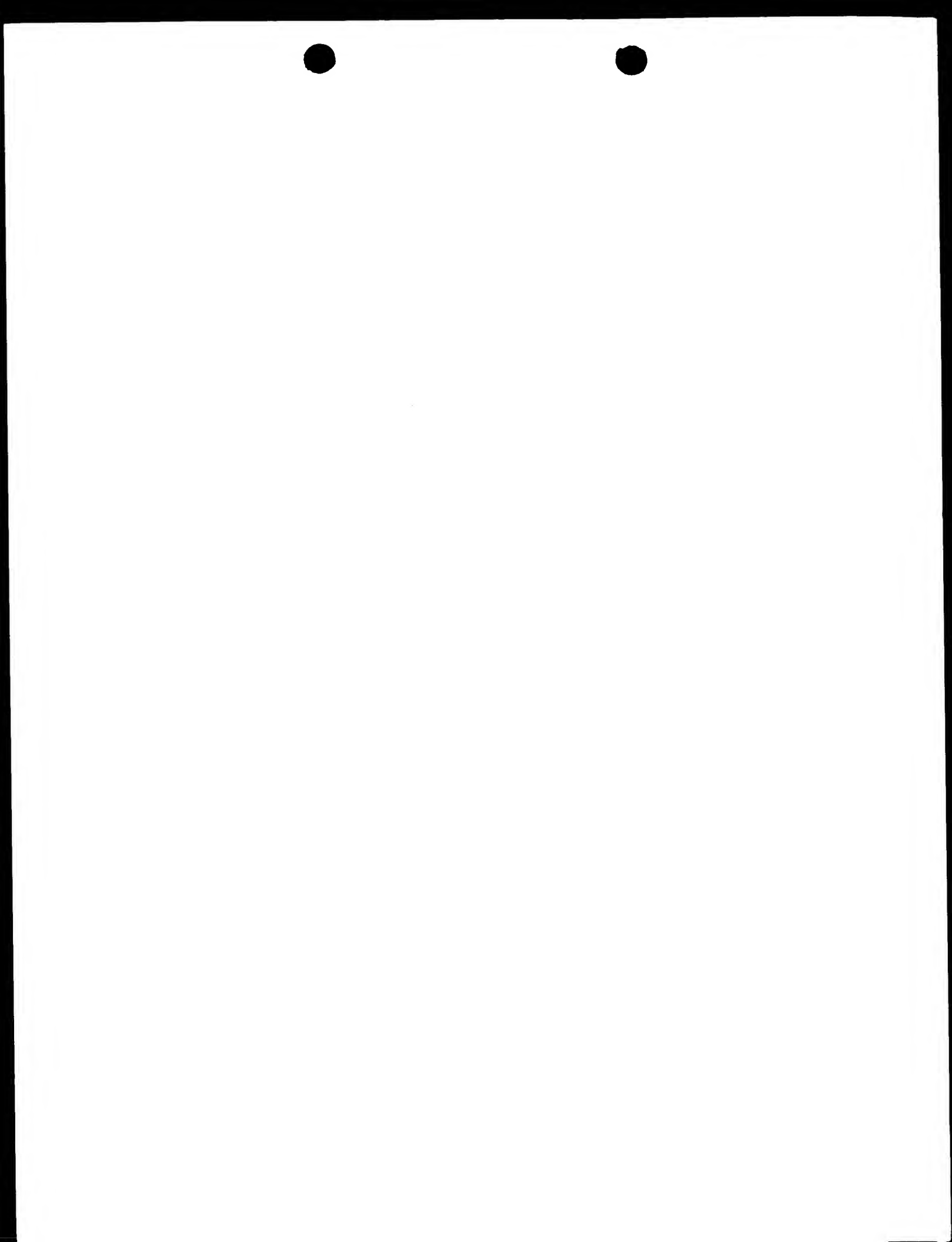
keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Für weitere Auskünfte siehe Formblatt PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

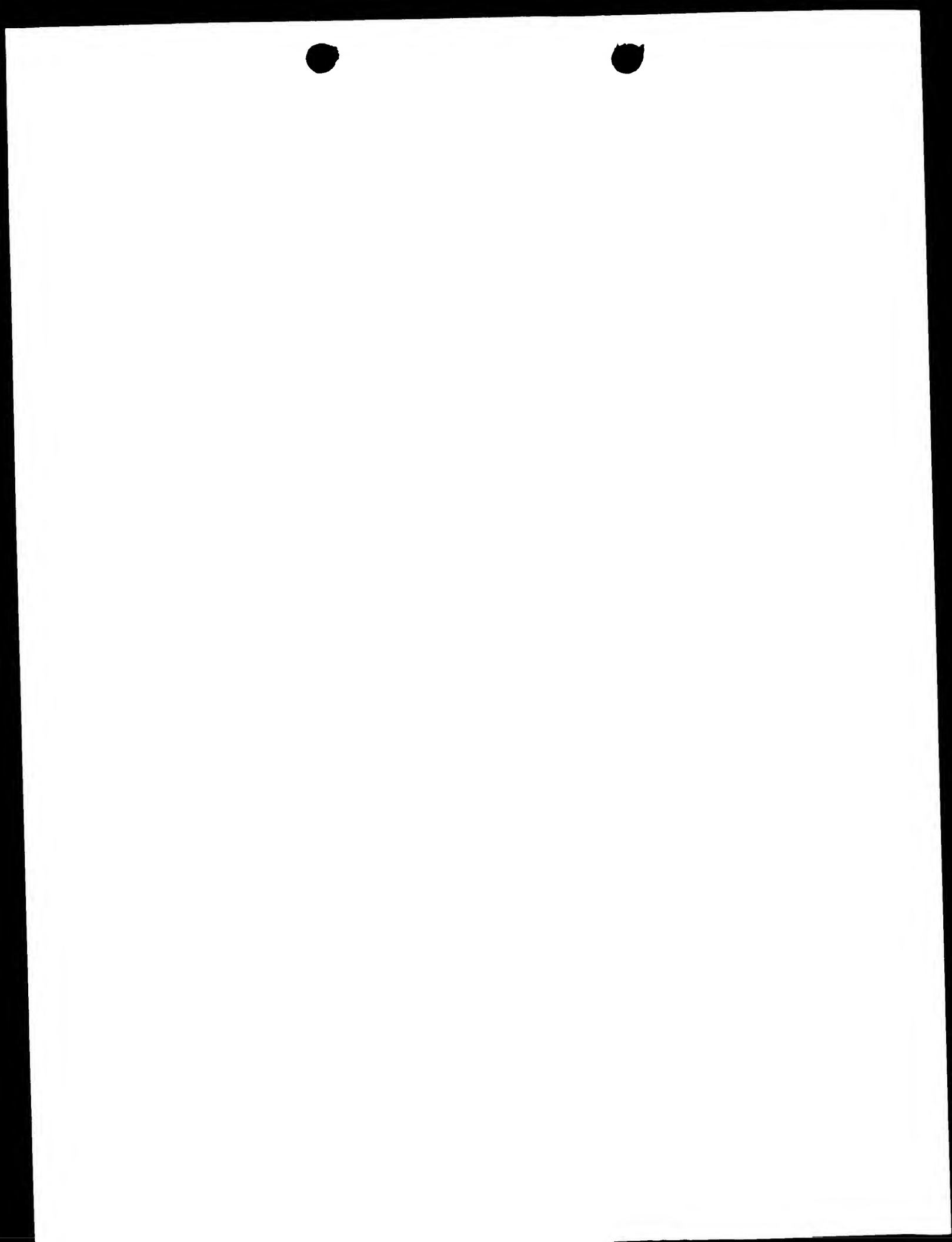
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

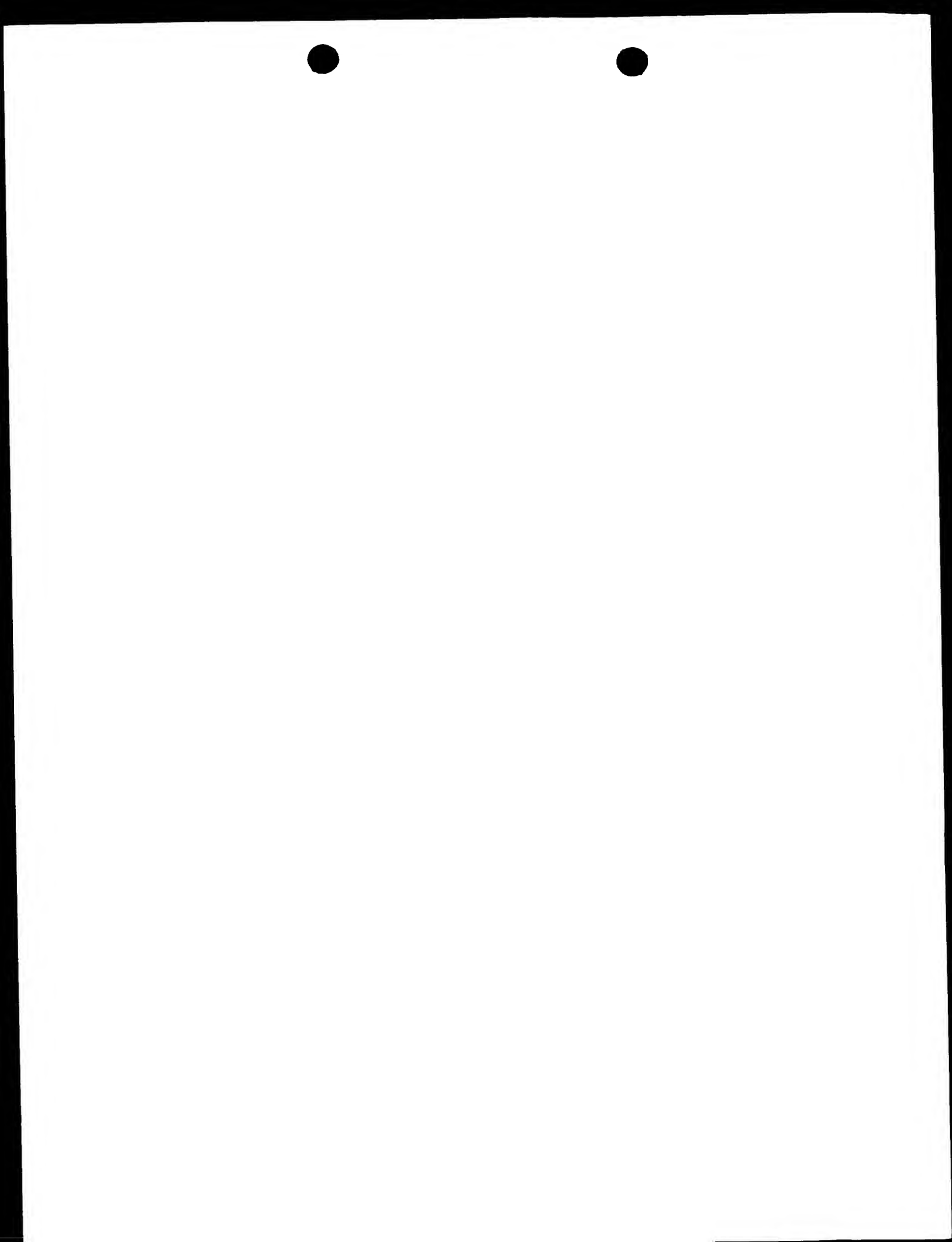


WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl Anspruch 19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 20 und 21 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff, Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole:

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank, Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe:

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 646 250 A (SUZUKI S) 8. Juli 1997 siehe Beispiele 2.3 ---	1-3, 10-15
A	EP 0 585 801 A (HOECHST JAPAN LIMITED) 9. März 1994 siehe Beispiele 5-7; Tabelle 1 ---	1, 2, 7, 10-15
A	HIDENOBU TANIHARA ET AL: "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin" CELL ADHESION AND COMMUNICATION, Bd. 2, 1. Januar 1994, Seiten 15-26, XP000576845 siehe Abbildungen 1-7 --- -/--	1-3, 7, 10-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

- A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/03/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

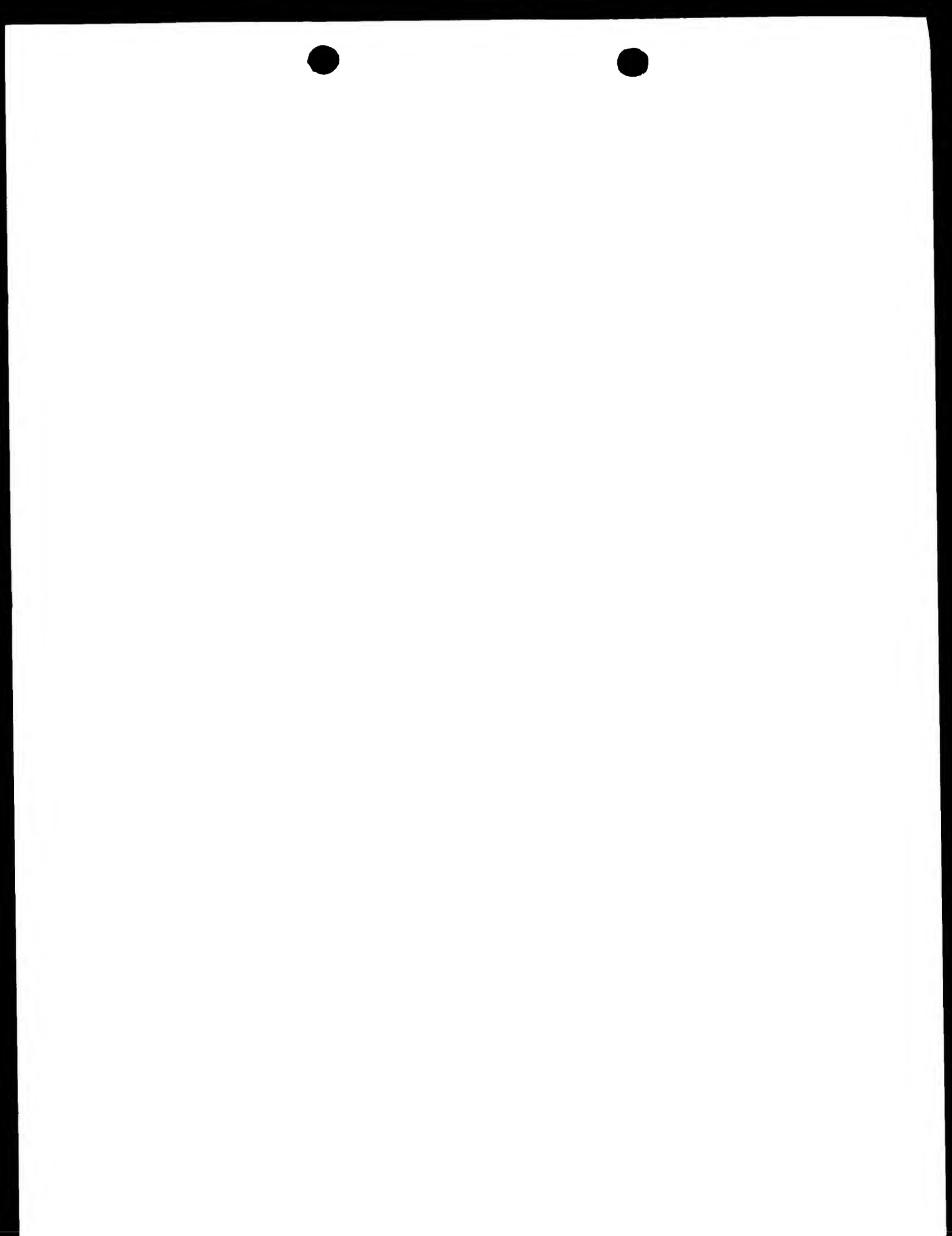
Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SELIG S ET AL: "Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated brain-specific cadherin"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>Bd. 94, Nr. 6, 18. März 1997, Seiten 2398-2403, XP002095155</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>siehe Seite 2399, linke Spalte, Absatz 3-5</p> <p>-----</p>	<p>1.3.</p> <p>10-15</p>



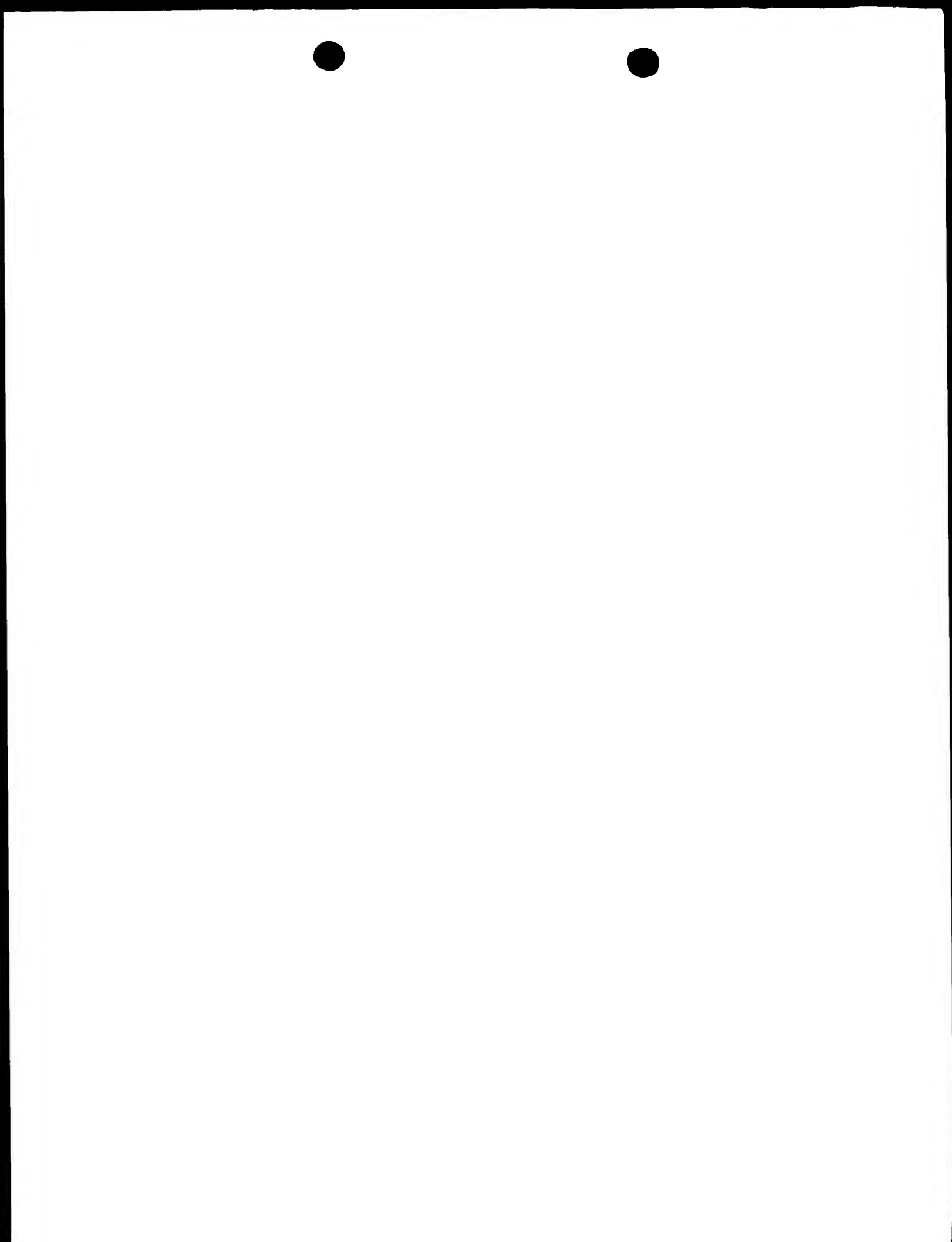
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/06547

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5646250	A	08-07-1997	US 5597725 A	28-01-1997
			CA 2111573 A	28-10-1993
			EP 0604603 A	06-07-1994
			JP 7500019 T	05-01-1995
			WO 9321302 A	28-10-1993
			US 5639634 A	17-06-1997
<hr/>				
EP 585801	A	09-03-1994	AU 663216 B	28-09-1995
			AU 4492293 A	03-03-1994
			CA 2104997 A	01-03-1994
			JP 6122700 A	06-05-1994
			US 5869638 A	09-02-1999
<hr/>				



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 26 JAN 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 982066wo Me/Sch-gn	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06547	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/10/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/10/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/05/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.01.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Giebeler, K Tel. Nr. +49 89 2399 8546 



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06547

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-28 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 eingegangen am 07/12/1999 mit Schreiben vom 06/12/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

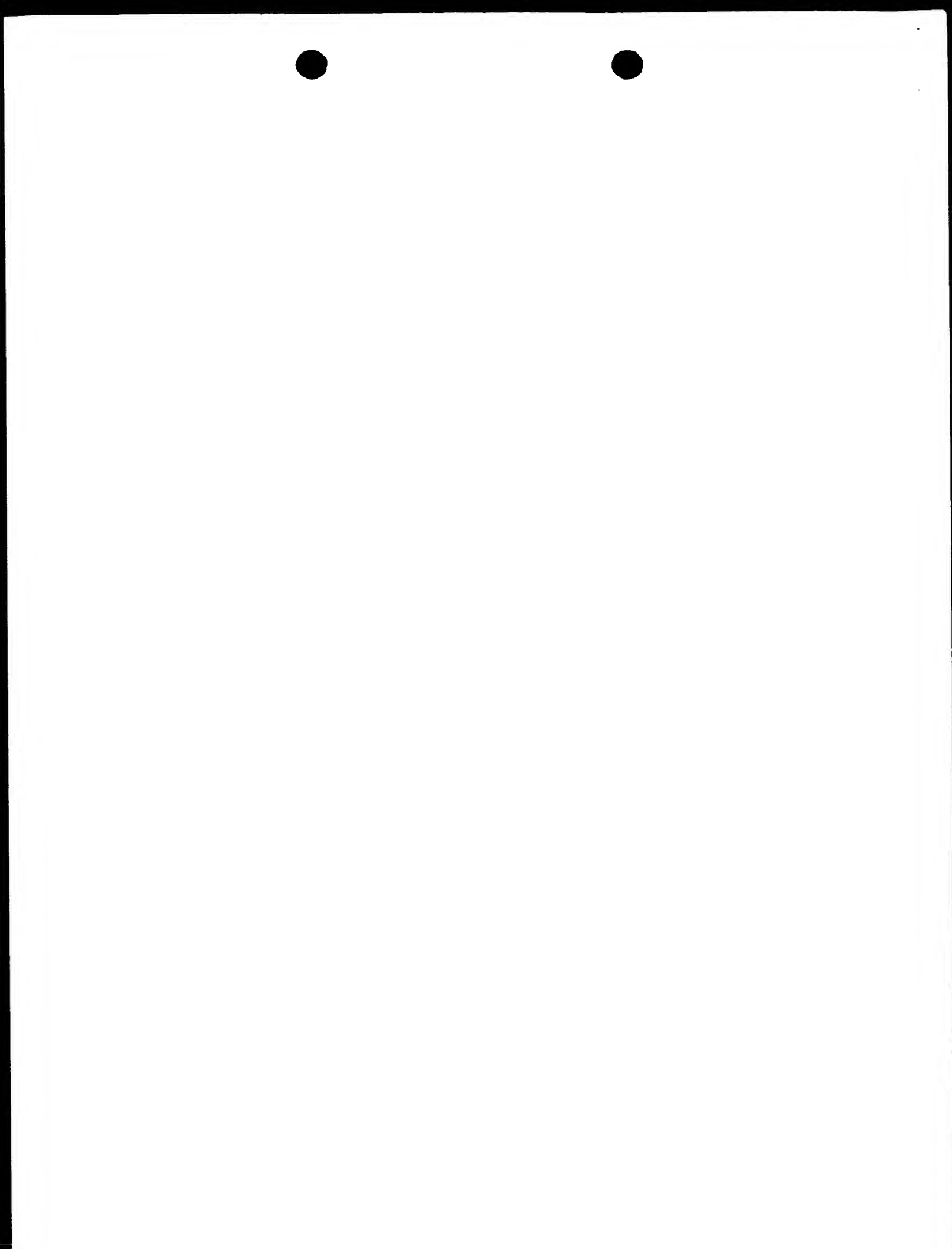
siehe Beiblatt

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-11, 14
	Nein: Ansprüche	12, 13



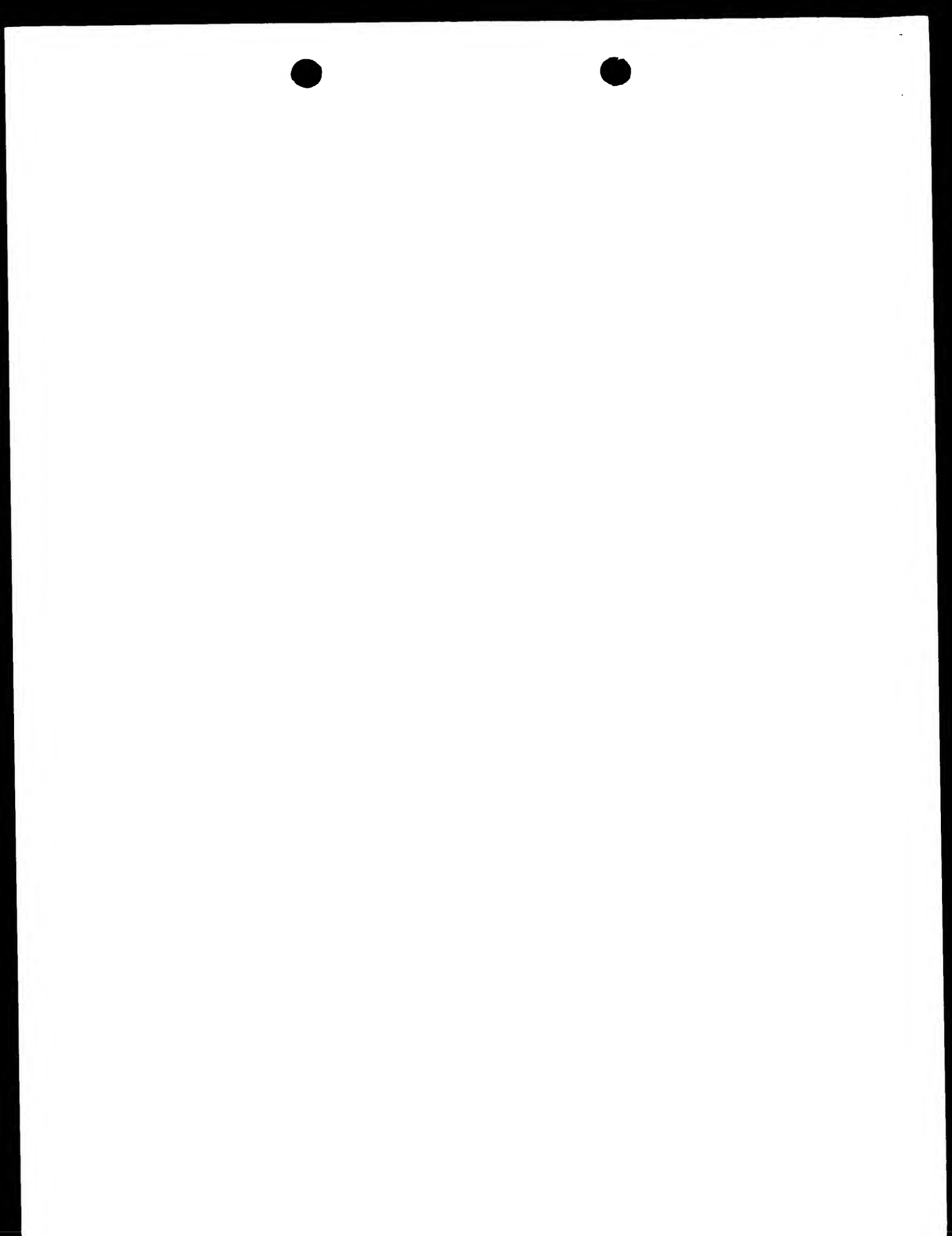
2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt



Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

1. Die mit Schreiben vom 06.12.99 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um die Änderung der Sequenz des "Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138)" in Anspruch 4. Nach Meinung dieser Behörde handelt es sich dabei nicht um einen offensichtlichen Fehler. Aus der Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung ist nicht zu erkennen, daß die in der vorgeschlagenen Berichtigung angegebene Sequenz beabsichtigt war. Auch aus dem Dokument D3 (CELL ADHESION AND COMMUNICATION (1994) 2: 15-26) ist die vorgeschlagene Berichtigung nicht klar ersichtlich, da sich die in Figur 5 dieses Dokumentes angegebene Sequenz auch an anderen Positionen des Sequenzbereichs 23-138 von der der Anmeldung unterscheidet. Folglich wurde die genannte Änderung bei der Erstellung dieses Berichts nicht berücksichtigt.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

2. Die Peptide der Ansprüche 1-4 werden als neu angesehen, weil sie gegenüber den in D3 (Abb. 1-7) offenbarten PräPro-Peptiden N-terminal verkürzt sind.

Außerdem scheinen diese Peptide aufgrund ihrer unerwarteten Wirkung als Wachstumsfaktor auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen. Bei der Lösung der technischen Aufgabe, weitere Peptide mit zellproliferativen, zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Eigenschaften bereitzustellen, wäre es für den Fachmann nicht naheliegend gewesen, die beanspruchten Peptide zur Verfügung zu stellen. Folglich sind auch die Ansprüche 5-14 neu und erfinderisch.



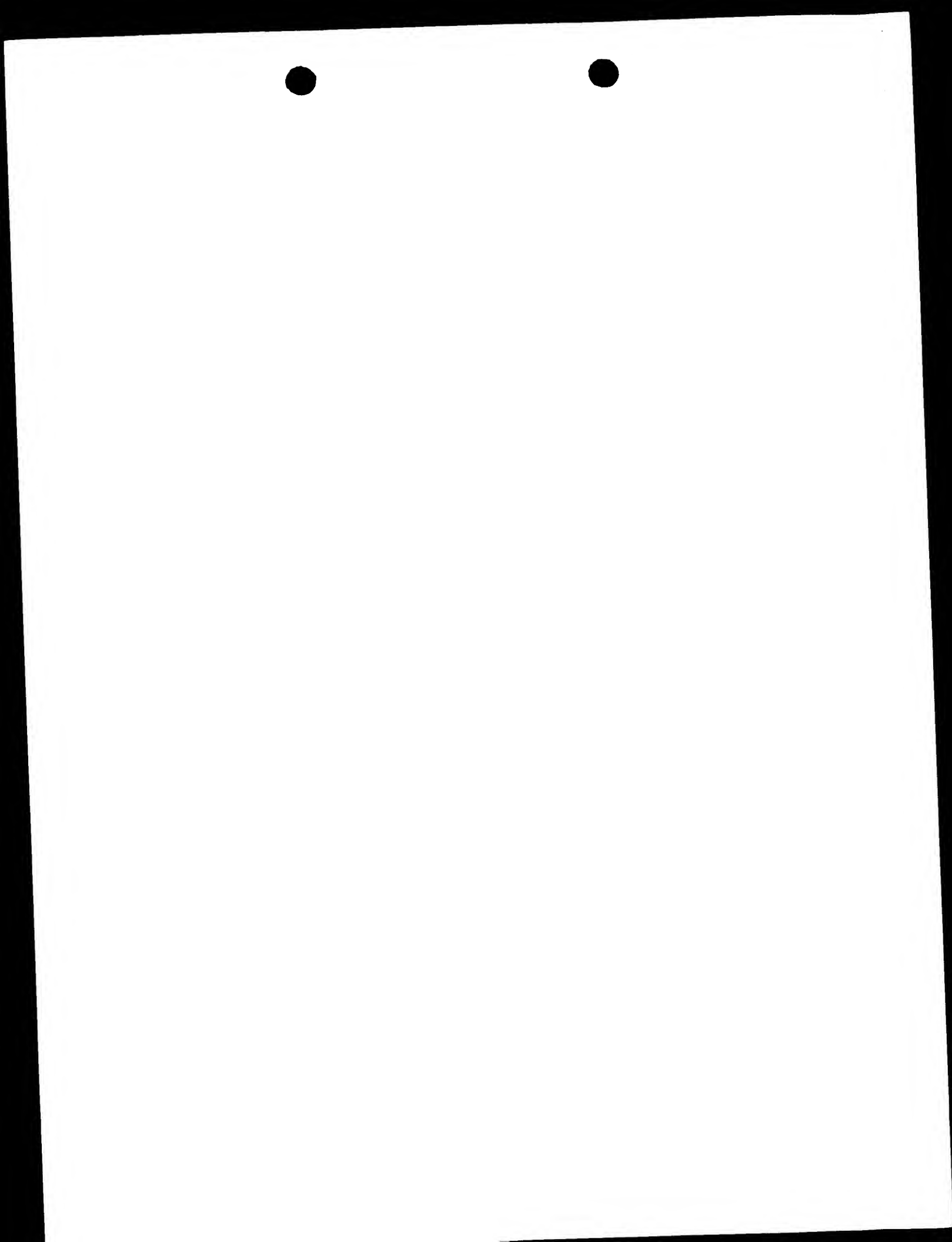
3. GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 12 und 13 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

4. Der in Anspruch 1 verwendete Ausdruck "dass das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist" ist unklar, entgegen Artikel 6 PCT, da nicht definiert ist, wie diese Aktivität zu messen ist. Es würde für den Fachmann einen unzumutbaren Aufwand darstellen, ein Peptid auf seine Wirkung auf alle denkbaren Zellarten und Zelllinien zu untersuchen, nur um festzustellen, ob es unter den Anspruch fällt.
5. Der Anspruch 4 scheint alle Merkmale des Anspruchs 1 zu enthalten und ist daher nicht richtig als ein von letzterem abhängiger Anspruch formuliert (Regel 6.4 PCT).
6. Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen.



Patentansprüche

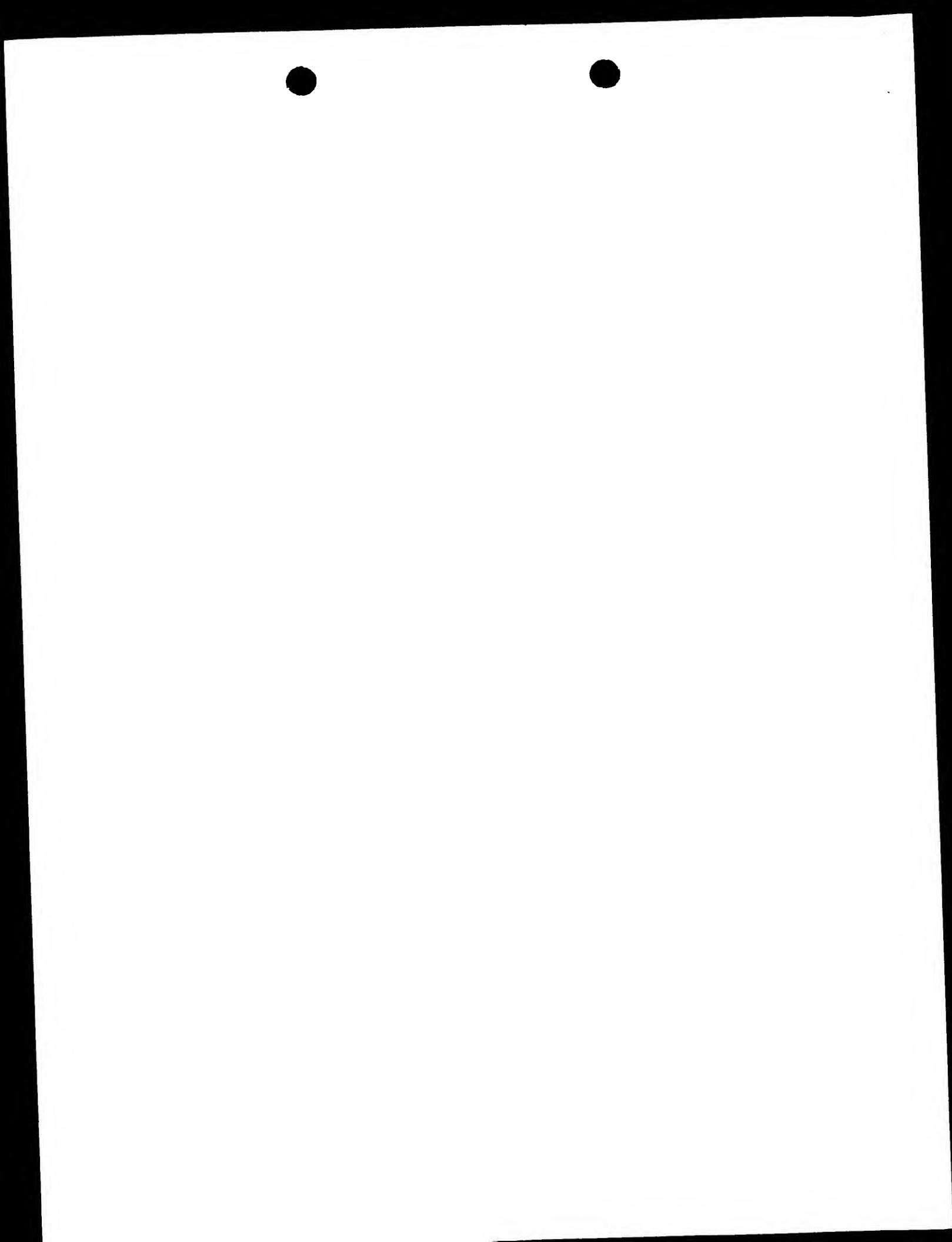
1. Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Peptid handelt, das bei der Prozessierung von Pro-Cadherin zu Cadherin als Pro-Sequenz abgespalten wird oder um ein Fragment davon handelt, und dass das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.
2. CDGF gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das CDGF zellproliferativ auf primäre Osteoblasten aus Rattencalvarien wirkt.
3. CDGF gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das CDGF zellprotektiv und/oder zelldifferenzierend auf primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen wirkt.
4. CDGF mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFTVPRRHLEGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGT
DGVITVKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNHHHRPPPHQAS
VSGIQAELLTFPNSSPGLRRQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVQYESS
EPADFKVDEDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTL
TEESVKESAEEIVFPRQFSKHSGHLQRQKR



Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREAQEVTLAAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDNDFFTNRNG
ETVQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHQR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTTRETCKAGFSEDDYTALISQNILEGKLLQVKSSCVGTKGTQYE
TNSMDFKGADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWDAVLVAQ
TSSPHSGHKPQKGKKVVALDPSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRQR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRRQR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNEINRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

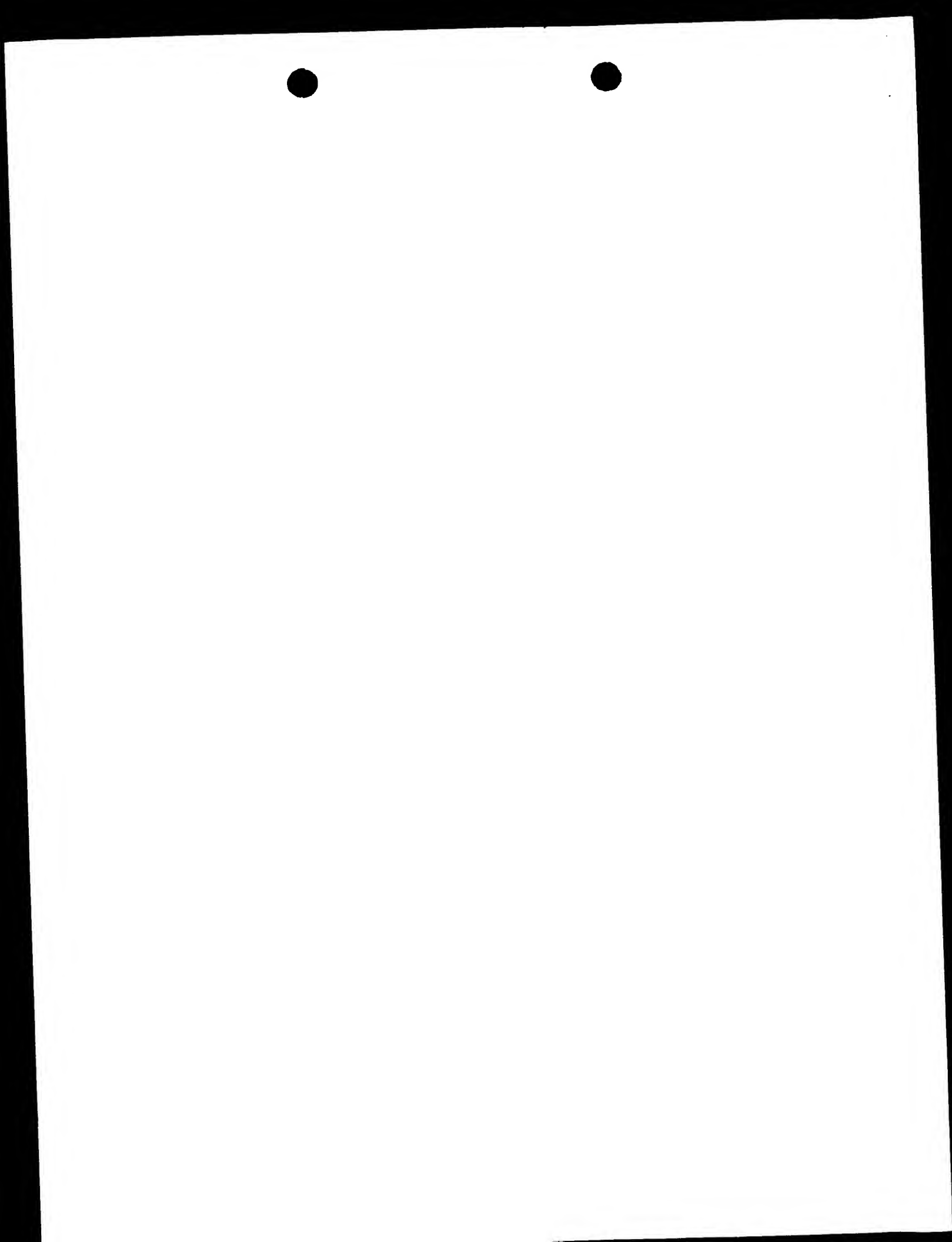
TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNEINRS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMSGSPLEINSLGEEQRILNR
SKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR



ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor (24-54):

QPQPQQTlatePRENVihlPGQRshfQrvKR

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor (24-52):

QPQPQQTlatePRENVihlPGQRshfQrv

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

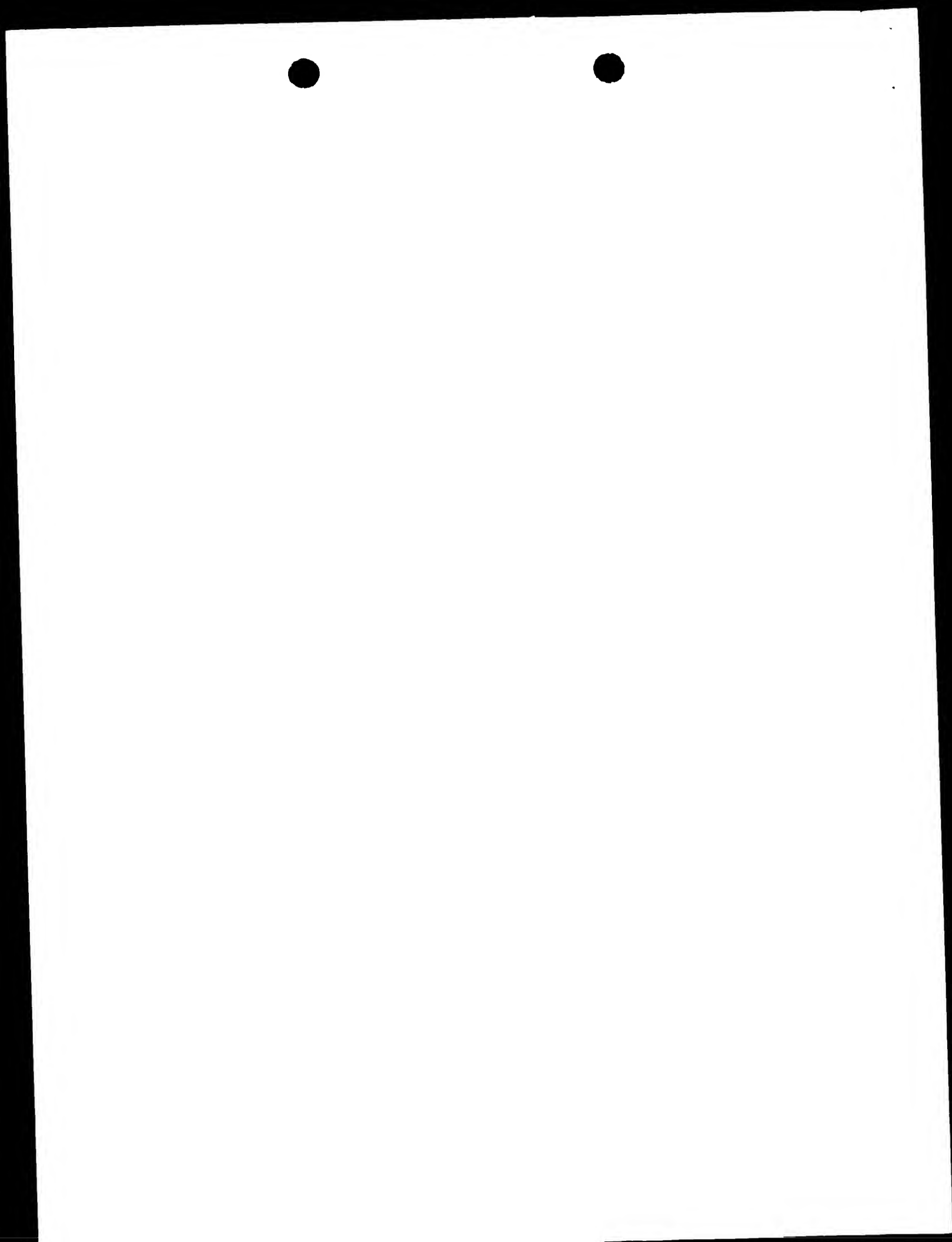
EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSdCKGNDKLRYEVSSPYF
KVNSDGGGLVALRNITAVGKTLFVHARTPHAEDMAELVIVGGKDISLQDIF
KFARTSPVPRQKRPSVLLLLSLFSLACL

oder

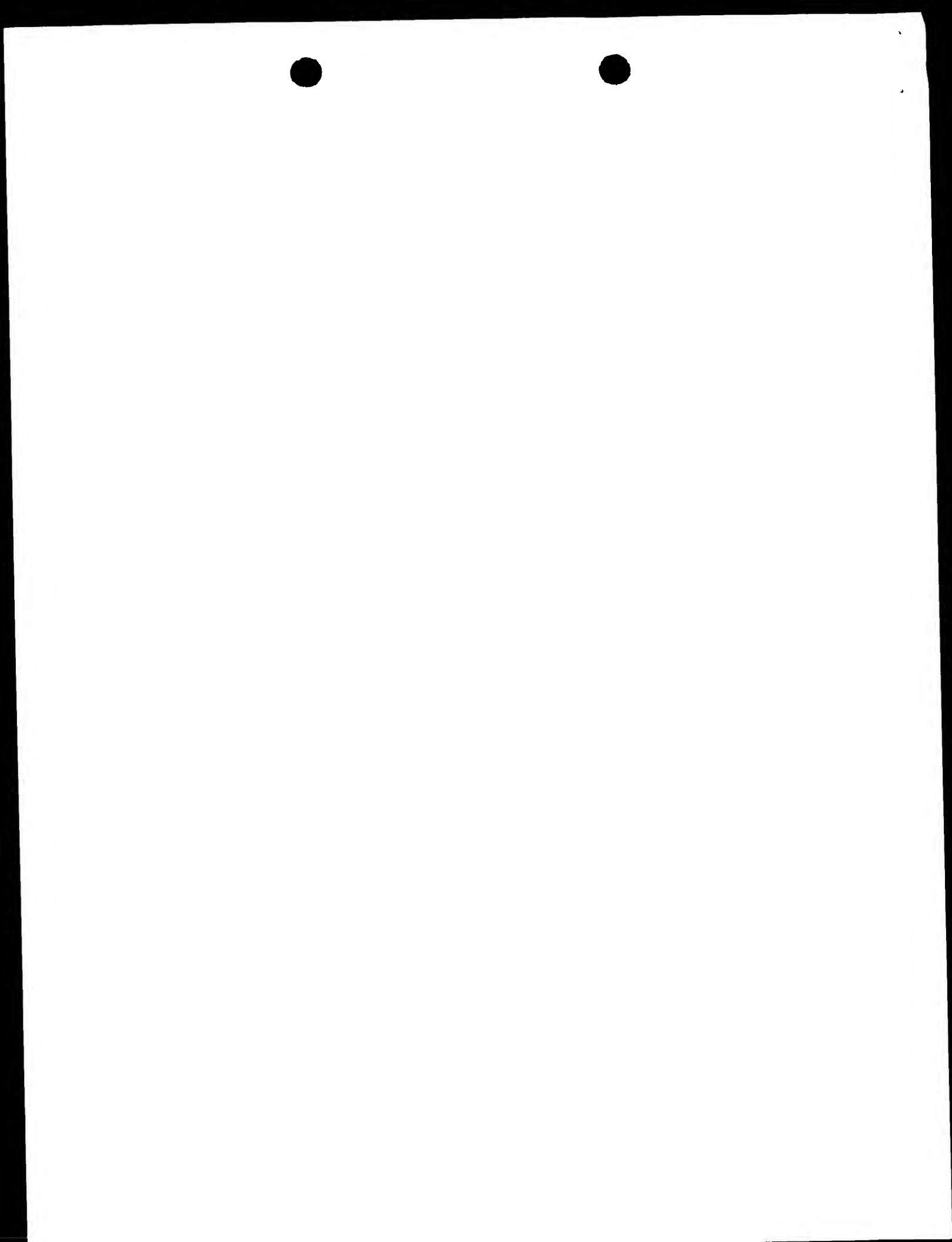
Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPISVSENHKKR

5. Nukleinsäuren codierend für CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, dass sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß Anspruch 5 ist.

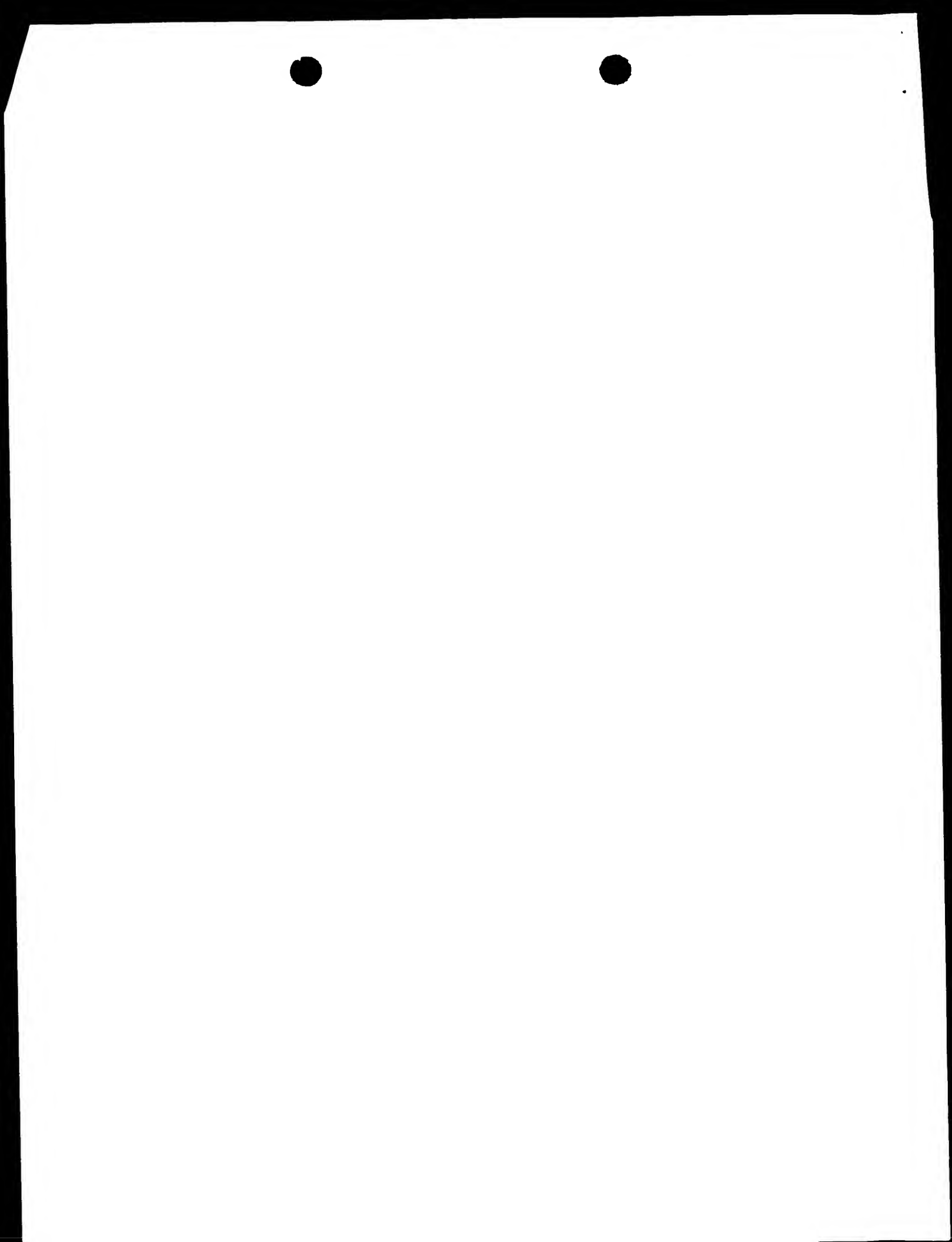


7. Vektoren enthaltend Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 bis 6.
8. Antikörper dadurch gekennzeichnet, dass sie gegen CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 gerichtet sind.
9. Arzneimittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 bis 6 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 8 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
10. Diagnostikmittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 5 bis 6 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 8 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
11. Arzneimittel gemäß Anspruch 9 in geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
12. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 9 oder 11 zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen,



gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

13. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 10 zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis, als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Tumormarker.
14. Verfahren zur Herstellung von CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4,
 - aus Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie oder
 - durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und Aufreinigung oder
 - durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12N 15/12, C07K 14/475, 16/22

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/19477

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

22. April 1999 (22.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06547

(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Oktober 1998 (15.10.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 45 284.1 15. Oktober 1997 (15.10.97) DE
198 13 088.0 25. März 1998 (25.03.98) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg
[DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÄNDKER, Ludger
[DE/DE]; Dohmeyers Weg 25, D-30625 Hannover
(DE). MEYER, Markus [DE/DE]; Heidering 38 a,
D-30625 Hannover (DE) MOSTAFAVI, Hossein [-/DE];
Fraunhoferstrasse 8, D-30163 Hannover (DE). OPITZ,
Hans-Georg [DE/DE]. Netztal 46, D-69469 Weinheim
(DE). KLING, Lothar [DE/DE]. Neckarpromenade 34,
D-68167 Mannheim (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41,
D-50462 Köln (DE).

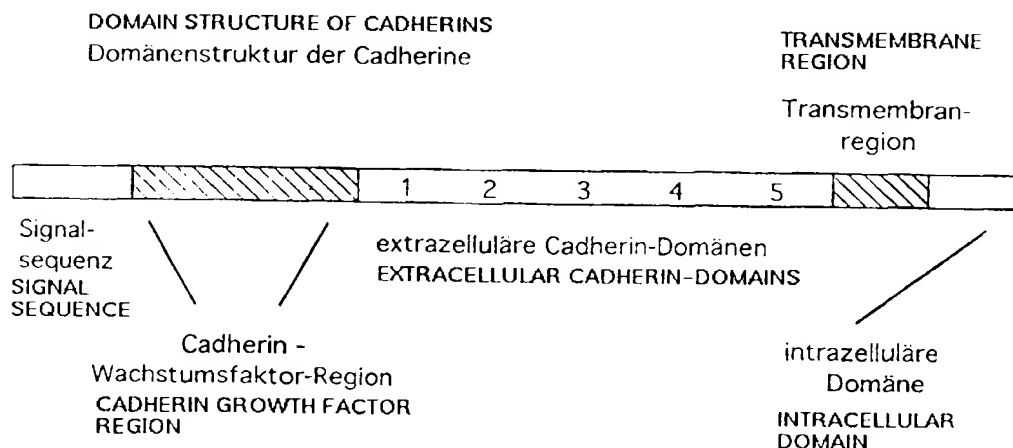
(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist: Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
entreffen.

(54) Title: CADHERIN DERIVED GROWTH FACTOR AND THE APPLICATION THEREOF

(54) Bezeichnung: CADHERIN DERIVED GROWTH FACTOR UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract

A peptide described as a cadherin derived growth factor (CDGF) has a sequence corresponding to a partial sequence of a pre-pro-cadherin, whereby the pre-pro-cadherin contains the domains of signal sequence, pro-sequence, cadherin repeats, transmembrane region and an intracellular domain. The invention is characterized in such a way that the sequence of the peptide comprises the pro-sequence, at least one of the other domains of the pre-pro-cadherin is absent, and the peptide contains cell proliferative, cell productive and/or cell differentiating properties.

(57) Zusammenfassung

Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Prä-Pro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Prä-Pro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

La	Sg	W	Da	Hi	HP	Me	TW	JH	K
30. DEZ. 1998									
F15.5.99/1									

Date of mailing (day/month/year) 15 December 1998 (15.12.98)	
Applicant's or agent's file reference 982066wo Me	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP98/06547	International filing date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 15 October 1997 (15.10.97)
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
15 Octo 1997 (15.10.97)	197 45 284.1	DE	07 Dece 1998 (07.12.98)
25 Marc 1998 (25.03.98)	198 13 088.0	DE	07 Dece 1998 (07.12.98)

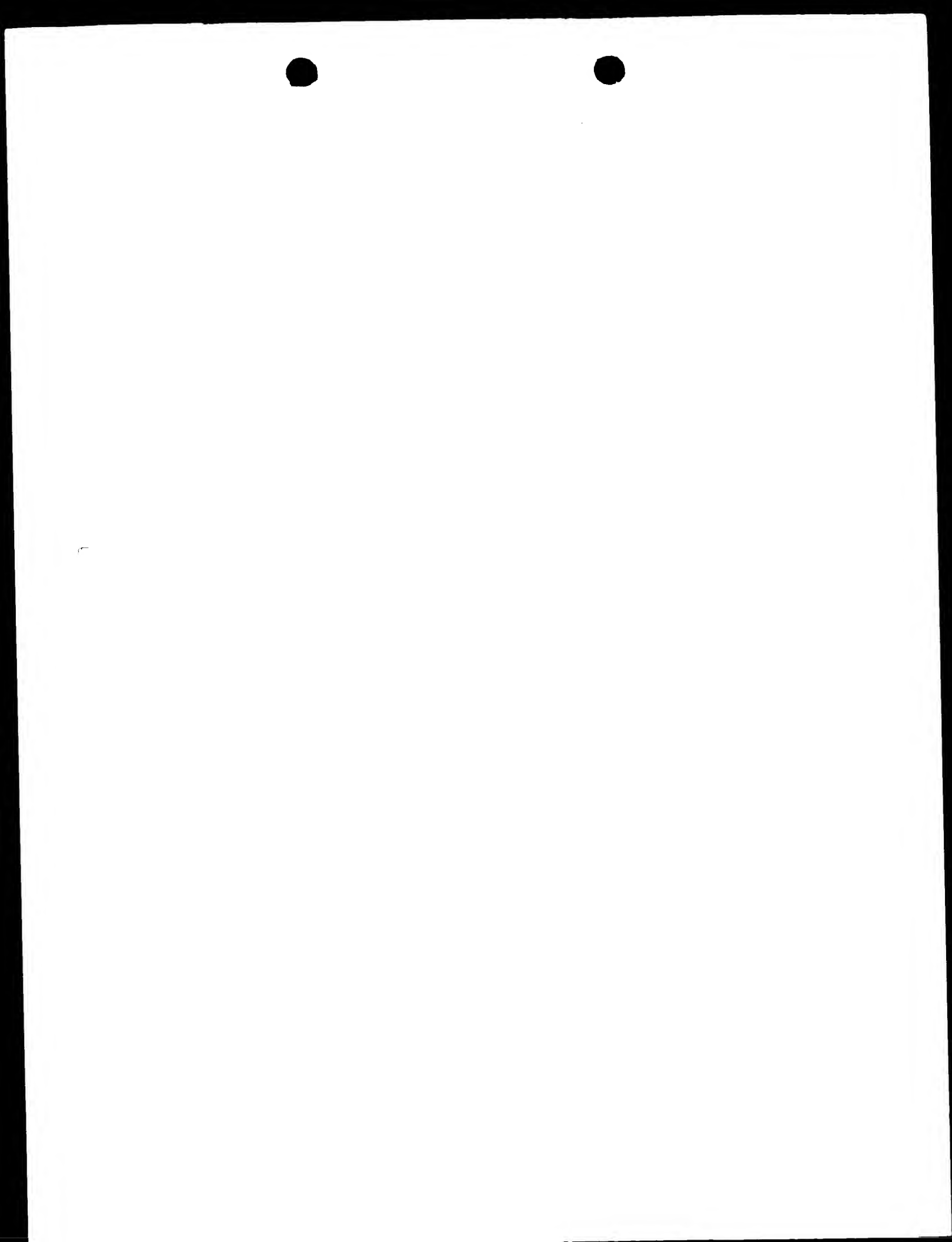
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer


Dorothee Mülhausen

Telephone No. (41-22) 338.83.38



Sg	W	Ca	Hi	P	ME	TA	JH	K
30. APR. 1999								
PCT								

PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/19477
PCT/EP98/06547

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:
MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 22 April 1999 (22.04.99)		
Applicant's or agent's file reference 982066wo Me		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/EP98/06547	International filing date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)	
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al		Priority date (day/month/year) 15 October 1997 (15.10.97)

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 22 April 1999 (22.04.99) under No. WO 99/19477

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



Continuation of Form PCT/IB/308

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

Date of mailing (day month year) 22 April 1999 (22.04.99)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 982066wo Me	International application No. PCT/EP98/06547
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

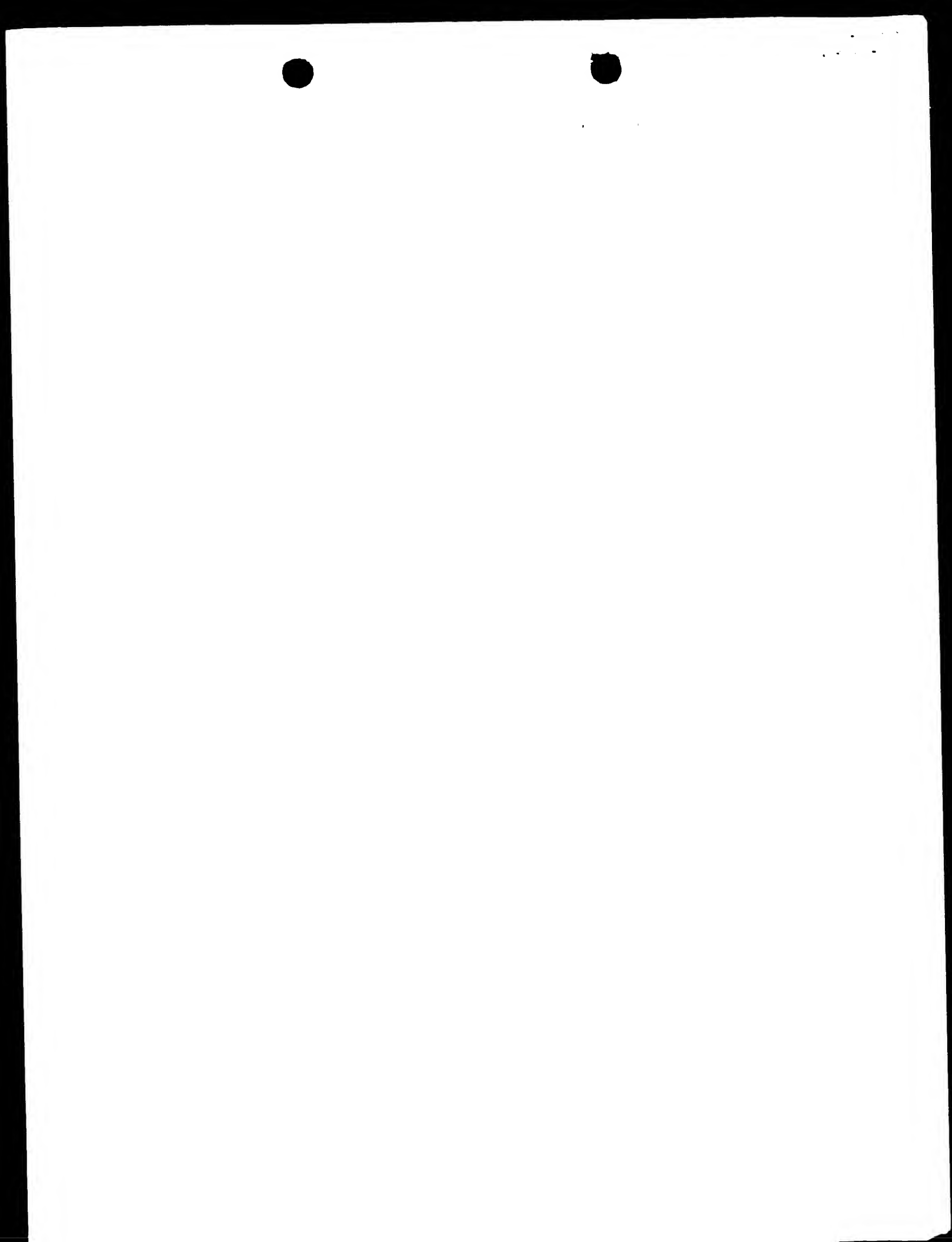
For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.





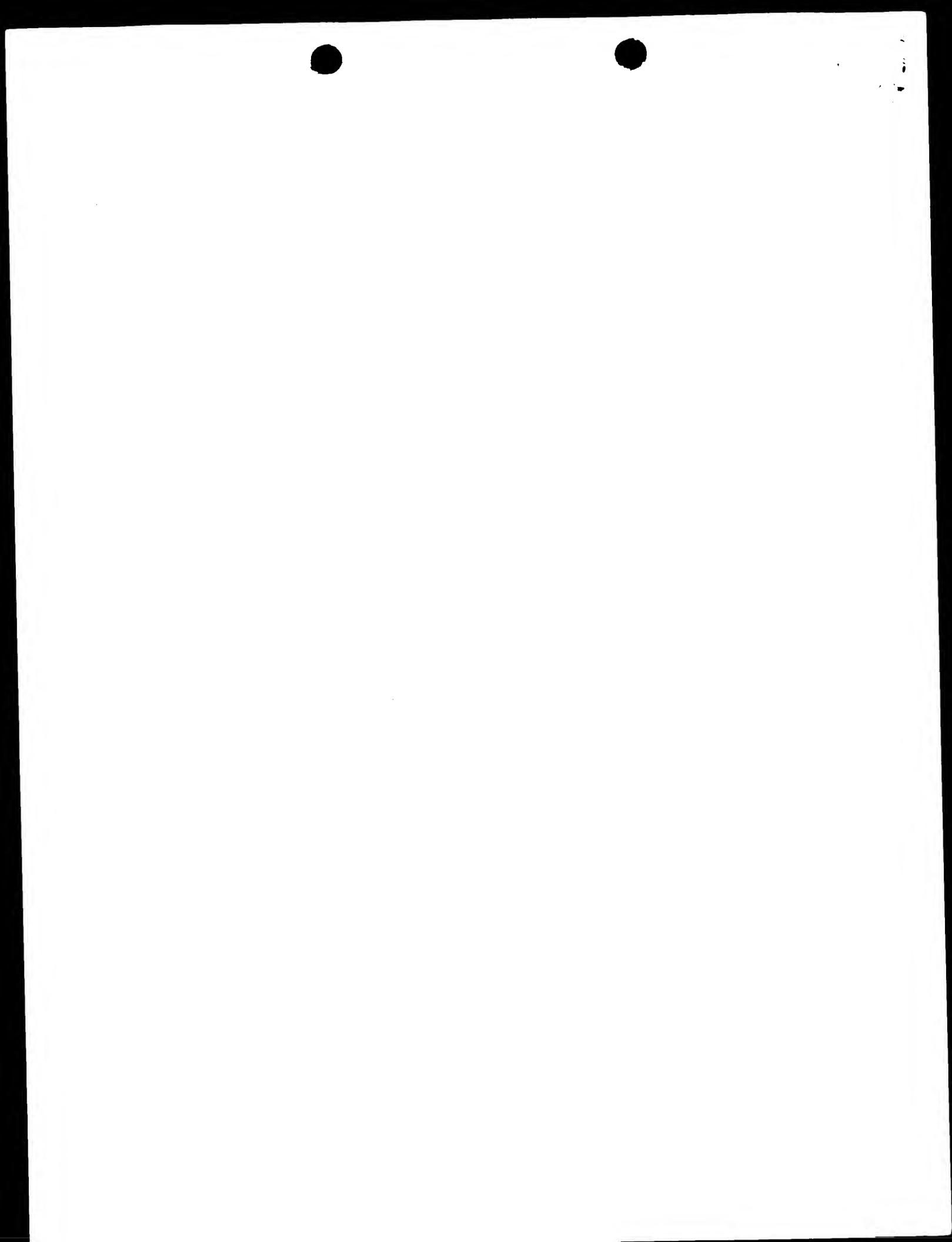
European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 93 11 3602

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 5)
P, X	WO-A-93 00353 (US DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICE) 7 January 1993 * The whole document and especially sequence Nr. 13 * -----	1-12	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 5)
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search		Date of completion of the search	Examiner
THE HAGUE		15 April 1994	Nauche, S
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons * : member of the same patent family, corresponding document	





UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

August 10, 2001

JACOBSON HOLMAN PLLC
William E. Player
400 Seventh Street, N.W.
Washington, DC 20004-2201

Dear Sir Madam,

This is to acknowledge receipt of your refund request in the amount of \$130.00
for patent serial number 09509559.

Your request has been forwarded to MARY ADEL for review and processing.

To inquire about the status of your refund request, please call 703-306-3338.

Thank you.

Refund Section, Office of Finance

